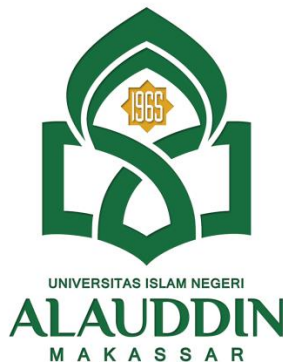


**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK N-HEKSAN DAUN BOTTO'-BOTTO'
(*Chromolaena odorata* L.) TERHADAP *CELL LINE* KANKER KOLON WiDr**



SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Meraih
Gelar Sarjana Farmasi Jurusan Farmasi
pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
UIN Alauddin Makassar

Oleh :

ANITSAH FIQARDINA
70100112066

**FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI ALAUDDIN MAKASSAR
2016**

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK N-HEKSAN DAUN BOTTO'-BOTTO'
(*Chromolaena odorata* L.) TERHADAP *CELL LINE* KANKER KOLON WiDr**



SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Meraih
Gelar Sarjana Farmasi Jurusan Farmasi
pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
UIN Alauddin Makassar

Oleh :

ANITSAH FIQARDINA

70100112066

**FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI ALAUDDIN MAKASSAR
2016**

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Mahasiswa yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anitsah Fiqardina

NIM : 70100112066

Tempat/Tgl. Lahir : Bulukumba/ 13 Desember 1993

Jur/Prodi/Konsentrasi : Farmasi

Fakultas/Program : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Alamat : Btn Minasa Upa Komplek Bosowa Permai B1 No.22

Judul : Uji Sitotoksik Ekstrak N-Heksan Daun Botto'-Botto'
(*Chromolaena odorata* L.) terhadap *Cell Line* Kanker Kolon
WiDr.

Menyatakan dengan sesungguhnya dan penuh kesadaran bahwa skripsi ini benar adanya hasil karya sendiri. Jika di kemudian hari terbukti bahwa ia merupakan duplikat, tiruan, plagiat, atau dibuat oleh orang lain, sebagian atau seluruhnya, maka skripsi dan gelar yang diperoleh karenanya batal demi hukum.

Makassar, 26 Juli 2016

Penyusun,

ANITSAH FIQARDINA
NIM. 70100112066

PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul “**Uji Sitotoksik Ekstrak N-Heksan Daun Botto’-Botto’ (*Chromolaena odorata* L.) terhadap Cell Line Kanker Kolon WiDr**” yang disusun oleh Anitsah Fiqardina, NIM 70100112066, mahasiswa Jurusan Farmasi pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar, diuji dan dipertahankan dalam Ujian Sidang Skripsi yang diselenggarakan pada hari Kamis, 25 Agustus 2016 M yang bertepatan dengan tanggal 22 Dzulqaidah 1437 H, dinyatakan telah dapat diterima sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Sarjana pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Jurusan Farmasi.

Makassar,2016

.....1437

DEWAN PENGUJI

Ketua	: DR. Dr. H. Andi Armyn Nurdin., M.Sc.	(.....)
Sekretaris	: Mukhriani, S.Si, M.Si., Apt.	(.....)
Pembimbing I	: Surya Ningsi, S.Si., M.Si., Apt.	(.....)
Pembimbing II	: Dwi Wahyuni Leboe, S.Si., M.Si.	(.....)
Penguji Kompetensi	: Karlina Amir Tahir, S.Si., M.Si., Apt.	(.....)
Penguji Agama	: Drs. Nurkhalis Gaffar, M.Ag.	(.....)

Diketahui oleh :

Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
UIN Alauddin Makassar

Dr.dr. H. Andi. Armyn Nurdin, M.Sc.

NIP.19550203 198312 1 001

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji kita panjatkan kepada Allah swt atas segala nikmat kesehatan, kekuatan serta kesabaran yang diberikan kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan tepat pada waktunya. Rasa syukur yang tiada terhingga kepadaNya atas segala hidayah dan karunia yang penulis dapatkan. Salam dan shalawat senantiasa dikirimkan pada junjungan nabi besar Muhammad saw, keluarga beliau, dan sahabat beliau.

Skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar ‘sarjana farmasi’ di bidang farmasi. Besar harapan penulis agar skripsi ini menjadi penunjang ilmu pengetahuan ke depannya dan bermanfaat bagi orang banyak. Penulis sadari, skripsi ini jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis memohon maaf yang sebesar-besarnya atas kesalahan dan kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Banyak terima kasih penulis haturkan kepada pihak yang telah membantu selama penulis menjalani pendidikan kuliah hingga selesainya perampungan skripsi ini.

Terima kasih yang setulusnya kepada kedua orangtua penulis, Ayahanda tercinta H. Muhammad Nasrum, SE., MARS. dan Ibunda Hj. Irmawati, S.Pd., M.M. atas segala do’a, kesabaran, kegigihan, materi serta pengorbanan yang diberikan dalam membesarkan dan mendidik penulis hingga saat ini dan kepada saudara dan saudari kandung penulis, terima kasih untuk senyuman terindah kalian karena kita satu dan tidak terpisahkan.

Terima kasih pula kepada Bapak/ Ibu :

1. Prof. Dr. H. Musafir Pababari, M.Si., rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin Makassar.
2. Dr. dr. H. Andi Armyun Nurdin, M.Sc., Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar.
3. Dr. Nurhidayah, S.Kep., Ns, M.Kes., Wakil Dekan (bidang akademik), Dr. Andi Susilawaty, S.Si., M.Kes., Wakil Dekan (bidang administrasi dan keuangan), dan Dr. Mukhtar Lutfi, M.Ag., Wakil Dekan (bidang kemahasiswaan) Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
4. Haeria, S.Si., M.Si., Apt., ketua Jurusan Farmasi UIN Alauddin Makassar.
5. Mukhriani, S.Si., M.Si., Apt., sekretaris jurusan Farmasi UIN Alauddin Makassar.

6. Surya Ningsi, S.Si., M.Si., Apt., pembimbing I penelitian bagi penulis yang telah banyak memberikan arahan dan bimbingannya selama ini.
7. Dwi Wahyuni Leboe, S.Si., M.Si., pembimbing II penelitian bagi penulis yang sangat banyak memberi saran dan arahan selama penelitian.
8. Karlina Amir Tahir, S.Si., M.Si., Apt., penguji kompetensi.
9. Drs. Nukhalis Gaffar, M.Ag., penguji dan pembimbing agama dalam penyusunan skripsi penelitian bagi penulis.
10. Seluruh dosen, civitas dan keluarga besar Farmasi UIN Alauddin atas dukungan dan informasi yang diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan dan melaksanakan penelitian.
11. Keluarga besar Jurusan Farmasi UIN Alauddin Makassar angkatan 2012 “Isohidris” terima kasih atas dukungan, semangat, dan motivasinya
12. Terima kasih untuk teman seperjuanganku Fadilah Annisa Fajariah, selama penelitian di Yogyakarta.
13. Seluruh pegawai dan laboran di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta atas bantuan, motivasi, dan semangat kepada penulis selama menjalankan penelitian.
14. Semua pihak yang tidak sempat disebutkan namanya satu-persatu, terima kasih atas perhatian dan bantuan yang diberikan pada penulis selama ini.

Dengan kerendahan hati, penulis berharap agar skripsi ini mendapat ridha dari Allah swt dan memberi manfaat bagi masyarakat dan penikmat ilmu pengetahuan, khususnya kepada penulis sendiri. *Aamiin ya Rabbal Aalamin.*

Samata-Gowa, April 2016

Penyusun,

Anitsah Figardina

NIM. 70100112066

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	ii
PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL.....	x
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
 BAB I PENDAHULUAN	 1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Defenisi operasional dan ruang lingkup penelitian	4
1. Defenisi operasional.....	4
2. Ruang lingkup penelitian	5
D. Kajian pustaka	5
E. Tujuan dan Kegunaan Penelitian	6
1. Tujuan penelitian.....	6
2. Kegunaan Penelitian.....	6
 BAB II TINJAUAN TEORITIS	 8
A. Kanker	8
B. Kanker Kolon	10
C. WiDr.....	17
D. Kultur Sel	17
E. Toksisitas	18
F. Uji Sitotoksik	20
G. Ekstraksi.....	23

H. Uraian Tumbuhan.....	25
I. Tinjauan Islam Tentang Pengobatan.....	28
 BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	35
A. Jenis Penelitian.....	35
B. Pendekatan Penelitian	35
C. Alat dan Bahan.....	35
D. Metode Kerja.....	36
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
 BAB V PENUTUP.....	47
A. Kesimpulan	47
B. Implementasi penelitian	47
 DAFTAR PUSTAKA	48
 LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	52
 RIWAYAT HIDUP.....	68

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Penyiapan Sampel	52
Lampiran 2	Pembuatan Media Kultur	53
Lampiran 3	Penanaman Sel	54
Lampiran 4	Preparasi Sampel dan <i>Treatment</i>	55
Lampiran 5	Uji Sitotoksik MTT	56
Lampiran 6	Denah Lokasi Pengambilan Sampel dan Gambar Sampel.	57
Lampiran 7	Uji Sitotoksik Metode MTT.....	59
Lampiran 8	Sel WiDr Sebelum dan Setelah <i>Treatment</i>	61
Lampiran 9	Kontrol Negatif Sel WiDr	64
Lampiran 10	Perhitungan.....	66
Lampiran 11	Grafik Probit Log-Konsentrasi dan Perhitungan IC ₅₀ Ekstrak N-Heksan Daun Botto'-Botto' (<i>Chromolaena</i> <i>odorata</i> L.).....	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Lokasi Pengambilan Sampel Daun Botto'-Botto'	57
Gambar 2	Sampel Daun Botto'-Botto' (<i>Chromolaena odorata</i> L.)	58
Gambar 3	Kondisi Sel Sebelum Dilakukan <i>Treatment</i>	59
Gambar 4	Setelah <i>Treatment</i> Pemberian Sampel Uji.....	59
Gambar 5	Setelah Pemberian Reagen MTT dan telah diinkubasi 24 jam	60
Gambar 6	Setelah Pemberian SDS dan Telah Diinkubasi 24 jam.....	60
Gambar 7	Sel WiDr Sebelum <i>Treatment</i>	61
Gambar 8	Hasil treatment sel pada konsentrasi 1000 µg/ml.....	61
Gambar 9	Hasil treatment sel pada konsentrasi 500 µg/ml.....	62
Gambar 10	Hasil treatment sel pada konsentrasi 250 µg/ml.....	62
Gambar 11	Hasil treatment sel pada konsentrasi 125 µg/ml	63
Gambar 12	Hasil treatment sel pada konsentrasi 62,5 µg/ml.....	63
Gambar 13	Kontrol Sel.....	64
Gambar 14	Kontrol Media.....	64
Gambar 15	Grafik Probit Log-Konsentrasi Ekstrak N-Heksan Botto'-Botto'	67

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Hasil Perhitungan Rendemen	40
Tabel 2	Hasil Uji Sitotoksik Metode MTT Sel WiDr.....	40

ABSTRAK

Nama : Anitsah Fiqardina
NIM : 70100112066
Judul skripsi : Uji Sitotoksik Ekstrak N-Heksan Daun Botto'-Botto'
(*Chromolaena odorata* L.) Terhadap *Cell Line* Kanker Kolon
WiDr.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak n-heksan daun botto'-botto' pada cell line kanker kolon WiDr secara *in vitro* dan mengetahui berapa besar nilai IC_{50} dari ekstrak tanaman tersebut. Uji aktivitas sitotoksik ekstrak n-heksan daun botto'-botto' dilakukan dengan memberikan 5 seri konsentrasi bahan uji yaitu 1000 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$ dan 62,5 $\mu\text{g/ml}$; pada sel kanker kolon WiDr yang kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Penghitungan sel dilakukan setelah pemberian MTT dan SDS stopper. *Persentase inhibisi* yang dihasilkan dari masing-masing konsentrasi sampel uji secara berturut-turut adalah 97,9 %; 98,3%; 69,6%; 21,3%; dan 14,5%. Ekstrak n-heksan daun botto'-botto' mempunyai nilai IC_{50} sebesar 162,18 $\mu\text{g/ml}$. Hasil ini tidak memenuhi kriteria yang ditetapkan NCI *National Cancer Institute* sebagai antikanker yaitu dengan range <30 $\mu\text{g/ml}$. Analisis korelasi-regresi pada grafik menunjukkan hasil yang tidak linear untuk 5 seri konsentrasi sampel uji yang digunakan. Sehingga dapat disimpulkan ekstrak n-heksan daun botto'-botto' (*Chromolaena odorata* L.) tidak bersifat sitotoksik terhadap cell line kanker kolon WiDr.

Kata kunci : Sitotoksik, Kanker Kolon, Sel WiDr, *Chromolaena odorata* L.

ABSTRACT

Name : Anitsah Fiqardina
NIM : 70100112066
Script title : Citotoxic assay of n-hexan extract of botto'-botto' leaves (*Chromolaena odorata* L.) to the colon cancer WiDr cell line.

The aim of this research is to determine the cytotoxicity of n-hexan extract of botto'-botto' leaves in colon cancer WiDr cell line by in-vitro and understand its IC₅₀ level of that extract. Citotoxic activity assays of n-hexan extract of botto'-botto' leaves performed by given 5 concentration series of tested compound, they are 1000 µg/ml; 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml and 62.5 µg/ml;, given to colon cancer WiDr cell line then incubated for 24 hour. Cell counting was performed after given the MTT and SDS stopper Inhibited percentage which resulted from each concentration of samples consecutively 97,9%; 98.3%; 69.6%; 21.3%; and 14.5%. n-hexan extract of botto'-botto' leaves shows IC₅₀value, that is 162,18 µg/ml. This result does not conform *National Cancer Institute* criteria of a compound as an anti-cancer, which is range < 30 µg/ml. Regresion-corelation analysis in a graphic draw unlinear line for 5 concentration series of samples which are applied. In conclusion, N-hexan extract of botto'-botto' leaves (*Chromolaena odorata* L.) does not perform any cytotoxicity to the colon cancer WiDr cell line.

Keywords : Citotoxicity, colon cancer, WiDr cell, *Chromolaena odorata* L.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, kanker menjadi penyebab kematian sekitar 8,2 juta orang. Berdasarkan data GLOBOCAN, *International Agency for Research on Cancer* (IARC) diketahui bahwa pada tahun 2012 terdapat 14.067.894 kasus baru kanker dan 8.201.575 kematian akibat kanker di seluruh dunia. Penyebab terbesar kematian akibat kanker setiap tahunnya salah satunya disebabkan oleh kanker kolorektal (Kemenkes, 2015).

Kanker kolorektal merupakan salah satu jenis kanker yang terjadi pada mukosa kolon dimana penyakit ini mempunyai angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Berdasarkan studi epidemiologi yang dilakukan oleh Haggard, et al tahun 2009 dikatakan bahwa jumlah insiden kanker kolorektal di dunia mencapai 9% dari semua jenis kanker. Berdasarkan data dari *World Cancer Research Fund International* (WCRF) tahun 2008 kanker kolorektal menempati peringkat ketiga setelah kanker paru dan kanker payudara sebagai kanker dengan frekuensi terbanyak dengan 1,2 juta kasus baru. Data *World Health Organization* (WHO) tahun 2008 menempatkan kanker kolorektal pada urutan keempat setelah kanker paru, kanker lambung dan kanker hati sebagai penyebab kematian akibat kanker dengan 608.000 kematian. Berdasarkan jenis kelamin penderitanya di seluruh dunia, kanker kolorektal menempati posisi kedua umum terjadi pada pria (746.000 kasus atau sebesar 10 %) dan posisi ketiga pada wanita (614.000 kasus atau 9,2%) (Globocan, 2012).

Di Indonesia sudah mulai banyak data mengenai angka kejadian kanker kolorektal. Menurut Profil Kesehatan Indonesia tahun 2008, kanker kolorektal di Indonesia berada pada peringkat 9 dari 10 peringkat utama penyakit kanker pasien rawat inap di seluruh rumah sakit di Indonesia dengan jumlah kasus sebanyak 1.810 dengan proporsi sebesar 4,92%. Berdasarkan data Rumah Sakit Kanker Dharmais tahun 2010, kanker kolorektal masuk dalam 10 besar kanker tersering dimana kanker rektum menempati urutan keenam dan kanker kolon menempati urutan kedelapan. (Tatuhey dkk, 2012).

Masalah kanker umumnya dapat ditangani berdasarkan pada upaya pengangkatan jaringan kanker atau dengan mematikan sel kanker tersebut serta meminimalkan efek yang tidak diinginkan terhadap sel-sel normal. Hal ini harus diimbangi dengan pemberian obat-obatan berupa kemoterapi atau penyinaran dengan sinar X untuk mengatasi kemungkinan sel telah mengalami metastasi dan untuk menghambat proliferasi sel kanker yang mungkin masih tertinggal dan perlu terus dikembangkan usaha pengembangan obat yang aman dan efektif, salah satunya melalui eksplorasi alam.

Indonesia merupakan negara kedua setelah Brazil yang memiliki keanekaragaman genetik cukup banyak. Para ilmuwan telah banyak menggali dan mengeksplorasi kekayaan alam untuk mencari peluang dalam mengembangkan obat-obatan baru (Hermani, 2006). Namun demikian, sampai sejauh ini baik mengenai kandungan kimia, khasiat maupun efek sampingnya (tanaman/obat herbal) belum banyak dilaporkan atau diteliti secara ilmiah. Salah satu tumbuhan yang biasa digunakan masyarakat sebagai bahan obat adalah daun Botto'-botto' atau biasa disebut dengan nama Kirinyu (Sunda), tumbuhan ini oleh masyarakat hanya

digunakan sebagai obat luka dan secara luas juga dikenal sebagai gulma padang rumput dan perkebunan.

Botto'-Botto', *Chromolaena odorata* (L) (Asteraceae: Asterales) dalam bahasa Inggris disebut *siam weed* merupakan gulma padang rumput yang sangat luas penyebarannya di Indonesia. Gulma ini diperkirakan sudah tersebar di Indonesia sejak tahun 1910-an (Sipayung et al., 1991), dan tidak hanya terdapat di lahan kering atau pegunungan tetapi juga banyak terdapat di lahan rawa dan lahan basah lainnya (Thamrin dan Asikin, 2013).

Studi pendahuluan telah dilakukan dengan tujuan untuk menskrining senyawa toksik dari sampel ekstrak daun botto'-botto' dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan LC₅₀ ekstrak n-Heksan 10,91 µg/ml (Habritasari, 2014). Hasil dalam penelitian lain dilaporkan bahwa ekstrak n-heksan daun botto'-botto' berefek antimitosis pada sel telur bulubabi (*Tripneustus gratilla* Linn) dengan nilai IC₅₀ yaitu 11,85 µg/ml (Pratiwi, 2014). Selain itu penelitian yang dilakukan Suriyavathana M et al., tahun 2012 membuktikan adanya kandungan dari ekstrak daun botto'-botto' yang memberikan efek antioksidan seperti kita ketahui bahwa antioksidan dapat menangkal radikal bebas. Senyawa radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab kerusakan DNA di samping penyebab lain seperti virus. Bila kerusakan tidak terlalu parah, masih dapat diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA. Namun, bila sudah menyebabkan rantai DNA terputus di berbagai tempat, kerusakan ini tidak dapat diperbaiki lagi sehingga pembelahan sel akan terganggu. Bahkan terjadi perubahan abnormal yang mengenai gen tertentu dalam tubuh yang dapat menimbulkan penyakit kanker (Suryo, 2008).

Penelitian ini menguji aktivitas antikanker ekstrak daun botto'-botto' terhadap sel kanker kolon WiDr. Sel WiDr dipilih karena memiliki kelebihan yaitu mudah dikulturkan dan memiliki *doubling time* yang singkat bila dibandingkan dengan kultur sel kanker lainnya. Sel ini juga memiliki *plating efficiency* yang tinggi. (Noguchi et al., 1979).

Untuk menambah data ilmiah mengenai manfaat daun botto'-botto', utamanya dalam menemukan obat kanker alternatif, maka perlu dilakukan penelitian mengenai uji aktivitas ekstrak n-heksan daun botto'-botto' terhadap penghambatan sel WiDr.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak n-heksan daun botto'-botto' dapat menghambat *cell line* kanker kolon WiDr?
2. Berapakah nilai IC_{50} ekstrak n-heksan daun botto'-botto' terhadap *cell line* kanker kolon WiDr ?

C. Definisi Operasional dan Ruang Lingkup Penelitian

1. Definisi Operasional
 - a. Uji Sitotoksik adalah uji toksisitas secara in vitro menggunakan kultur sel yang digunakan dalam evaluasi keamanan obat, kosmetika, zat tambahan makanan, pestisida dan digunakan juga untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa (Doyle and Griffiths, 2000).
 - b. Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan mekanisme tidak normal dan tidak terkontrol pada pengaturan kelangsungan hidup, proliferasi dan diferensiasi sel. Jika penyebaran kanker tidak terkontrol maka dapat menyebabkan kematian (Hondenmarck, 2003).

- c. *Colorectal adenomacarcinoma cell line* (WiDr) merupakan lini sel yang diderivatisasi dari sel kanker kolon manusia (Chen et al., 1987).
- d. Daun botto'-botto' mengandung beberapa senyawa kimia berupa alkaloid, glikosida sianogen, flavonoid, saponin, tannin yang berkhasiat untuk kesehatan (Harbone 1973).
- e. IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50*) didefinisikan besarnya konsentrasi inhibitor yang dapat menghambat enzim sebesar 50% (Takasaki et al, 2004).

2. Ruang Lingkup Penelitian

Disiplin ilmu yang terkait dengan penelitian ini adalah uji sitotoksik dari ekstrak n-heksan daun botto'-botto' terhadap *cell line* kanker kolon WiDr.

D. Kajian Pustaka

Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Akinmoladun et. al., (2007) yang berjudul *Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of Chromolaena odorata* menyebutkan bahwa ekstrak methanol yang diujikan mengandung alkaloid, tannin, steroid, terpenoid dan flavonoid. Adapun aktivitas presentasi antioksidan dari tumbuhan ini cukup tinggi dan dikatakan berpotensi untuk sejenis tumbuhan gulma.

Dalam jurnal nutrisi Pakistan, *Chemical Profile of Chromolaena odorata L.* (King and Robinson) Leaves oleh Ngozi et. al., 2009 dilaporkan bahwa *Chromolaena odorata* kaya akan protein asam amino esensial khususnya histidin dan phenylalanine. Selain itu, tumbuhan ini memiliki kandungan serat yang baik. Beberapa bukti epidemiologi menunjukkan bahwa peningkatan konsumsi serat

dapat menyebabkan pengurangan dalam kejadian penyakit tertentu termasuk kanker usus besar.

In-vitro Antioxidant Activity of *Chromolaena odorata* oleh Suriyavathana et. al., 2012. Dalam penelitiannya menyimpulkan bahwa daun dari tumbuhan *Chromolaena odorata* dapat digunakan sebagai antioksidan alami dan dikembangkan sebagai pengganti dari antioksidan sintetis.

Omotayo et. al., (2015) dalam penelitiannya yang berjudul Antibacterial Activity of *Crassocephalum crepidioides* (Fire weed) and *Chromolaena odorata* (Siam weed) hot aqueous leaf extract, melakukan *screening* fitokimia terhadap kedua sampel tersebut dan berhasil mengidentifikasi senyawa-senyawa yang terkandung dalam sampel tersebut diantaranya, alkaloid, tannin, flavonoid, saponin, steroid dan fenol. Dalam penelitian ini pula dibuktikan bahwa kedua sampel tersebut berpotensi sebagai antibakteri spectrum luas, karena dapat menghambat bakteri gram positif dan bakteri gram negatif.

E. Tujuan dan Manfaat Penelitian

1. Tujuan Penelitian

- a. Untuk mengetahui apakah ekstrak n-heksan daun botto'-botto' memiliki daya hambat terhadap *cell line* kanker kolon WiDr
- b. Untuk mengetahui seberapa besar penghambatan (IC_{50}) terhadap *cell line* kanker kolon WiDr

2. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi lebih lengkap mengenai potensi sitotoksik ekstrak n-heksan daun botto'-botto' terhadap *cell line*

kanker WiDr sehingga dapat memberikan kontribusi pada pengembangan daun botto'-botto' sebagai agen antiproliferasi .

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Kanker*

1. Pengertian Kanker

Kanker adalah penyakit yang menyerang proses dasar kehidupan sel, mengubah genom sel (komplemen genetik total sel) dan menyebabkan penyebaran liar dan pertumbuhan sel-sel. Penyebab mutasi genom berubah dari satu atau lebih gen atau mutasi dari segmen besar dari untai DNA yang mengandung banyak gen atau kehilangan segmen kromosom besar (Guyton, 1983).

Kanker merupakan penyakit yang berawal dari kerusakan gen, materi genetika atau DNA sel. Satu sel saja mengalami kerusakan genetika sudah cukup untuk menghasilkan sel kanker atau neoplasma. Sel yang gennya rusak itu dapat menjadi liar dan berkembang biak alias tumbuh terus tanpa henti dari satu sel menjadi beribu-ribu bahkan jutaan sel sehingga membentuk jaringan baru. Akhirnya terbentuklah jaringan tumor atau kanker (Mardiah, 2006).

Kriteria sitologi yang memungkinkan ahli patologi untuk mendiagnosis, atau mencurigai adanya kanker, adalah sebagai berikut (Ruddon, 2007):

1. Morfologi sel kanker biasanya berbeda dan lebih bervariasi dari sel normal pada jaringan yang sama. Ukuran dan bentuk sel kanker lebih bervariasi
2. *Nucleus* sel kanker biasanya lebih besar dan kromatinnya lebih terlihat (*hipercromatic*) dari pada *nucleus* pada sel normal; rasio *nuclear* dari sitoplasma seringkali lebih tinggi; dan *nuclei* sel kanker menonjol, nucleoli besar.

3. Jumlah sel yang bermitosis biasanya lebih banyak pada suatu populasi sel kanker dibandingkan pada populasi jaringan normal. Dua puluh atau lebih figur mitosis per 1000 sel sering dijumpai pada jaringan kanker, sedangkan kurang dari satu per 1000 biasa ditemui pada tumor jinak atau jaringan normal yang memiliki tingkat pertumbuhan yang tinggi seperti pada sumsum tulang atau sel *crypt* pada mukosa gastrointestinal.
4. Banyaknya mitosis abnormal atau sel raksasa, *pleomorphic* (variasi ukuran dan bentuk) atau *nuclei* lebih dari satu biasa ditemukan pada jaringan ganas daripada jaringan normal.
5. Invasi jaringan normal oleh neoplasma menunjukkan bahwa tumor telah menginvasi dan menyebar

Karsinogenesis dapat dibagi dalam tiga fase utama (Kartawiguna, 2001).:

a. *Fase inisiasi*

Fase ini berlangsung cepat. Tempat yang diserang adalah asam nukleat (*DNA/RNA*) atau protein dalam sel. Ikatan karsinogen dengan *DNA* menghasilkan lesi di materi genetik. *RNA* yang berikatan dengan karsinogen termodifikasi menjadi *DNA* yang dimutasi. Replikasi *DNA* terjadi karena terdapatnya sel nekrotik sebagai akibat karsinogen. Replikasi ini dapat diinduksi oleh lain bahan kimia toksik, bakteri (misalnya *Colitis ulcerativa* menjadi kanker kolon).

b. *Fase Promosi*

Promosi adalah proses yang menyebabkan sel terinisiasi berkembang menjadi sel preneoplasma oleh stimulus zat lain (promotor). Dari penyelidikan pada kultur jaringan diketahui fase ini berlangsung bertahun-tahun (10 tahun atau lebih) dan reversible sebelum terbentuknya sel tumor yang otonom. Lemak adalah

promotor untuk kanker payudara, kolon, endometrium, serviks, ovarium, prostat dan kandung empedu. Kurangnya serat dalam makanan antara lain menyebabkan kontak dengan karsinogen lebih lama, memudahkan seseorang terkena kanker kolon. Dari penyelidikan didapatkan serat dalam makanan mungkin menurunkan inidens kanker kolon dengan cara mencegah interaksi asam empedu dengan enzim bakteri (flora usus) dalam usus besar, mencegah pengikatan asam empedu dengan bahan kimia lain yang karsinogenik dalam feses, mengurangi waktu feses dalam usus besar dan menaikkan jumlah feses sehingga menurunkan konsentrasi karsinogen dalam usus.

c. *Fase progresi*

Fase ini berlangsung berbulan-bulan. Sel-sel menjadi kurang responsive terhadap sistem imunitas tubuh dan regulasi sel. Pada akhir fase ini gambaran histologist dan klinis menunjukkan keganasan.

B. Kanker Kolon

1. Defenisi kanker kolon

Kanker kolon adalah suatu kanker yang timbul pada sel epitel usus besar dan rektum yang disebabkan oleh terjadinya mutasi genetik kumulatif yang merubah proses dalam sel yang secara normal membatasi pembelahan yang berlebihan, migrasi, dan diferensiasi yang berakibat terjadinya proliferasi, invasi dan metastasis suatu sel. Ketidakstabilan genetis terus terjadi dan menyebabkan perubahan yang lebih lanjut, dan mempengaruhi sensitivitas terhadap terapi pada tumor yang ganas (Steinberg, 2012).

Perkembangan suatu sel menjadi sel tumor yang ganas merupakan proses yang memiliki tahapan dari mukosa normal menjadi adenoma dan pada akhirnya

menjadi adenoma invasif. Perkembangan malignan pada kolon dapat diketahui dengan mempelajari sekuen adenoma-karsinoma. Sebagian besar karsinoma berkembang dari suatu lesi polip pre-neoplastik adenomatus, kemudian terakumulasi dan terjadi perubahan di dalam sel epitel usus (Brown, 2004).

2. Faktor Resiko (Haggard, et., al. 2009)

a. Usia

Kemungkinan kanker kolorektal diagnosis meningkat setelah usia 40, meningkatkan secara progresif dari usia 40, dan meningkat tajam setelah usia 50. Lebih dari 90% dari kasus kanker kolorektal terjadi pada orang berusia 50 atau bahkan lebih tua. Tingkat kejadian lebih dari 50 kali lebih tinggi pada orang yang berusia 60 hingga 79 tahun dibandingkan pada mereka yang lebih muda.

b. Riwayat *Adenomatous Polip*

Seorang individu dengan riwayat adenoma memiliki peningkatan risiko pengembangan kanker kolorektal, daripada individu yang tidak memiliki riwayat sebelumnya adenomas. Sebuah periode laten yang panjang, diperkirakan 5 sampai 10 tahun, adalah biasanya diperlukan untuk pengembangan keganasan dari adenomas. Deteksi dan penghapusan sebuah adenoma sebelum transformasi ganas dapat mengurangi risiko kanker kolorektal. Namun, penghapusan adenomatosa atau karsinoma lokal dikaitkan dengan kemungkinan lain yaitu peningkatan perkembangan kanker *metachronous* lain di usus besar dan rektum.

c. Riwayat Penyakit Inflamasi Usus

Penyakit radang usus / *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) adalah istilah yang digunakan untuk menjelaskan dua penyakit, *colitis ulcerativa* dan penyakit *Crohn*. *Colitis ulcerativa* menyebabkan peradangan mukosa usus besar dan rektum. Penyebab penyakit *Crohn* peradangan dari dinding usus dan mungkin melibatkan setiap bagian dari saluran pencernaan dari mulut ke anus. Kondisi ini meningkatkan resiko individu mengalami perkembangan kanker kolorektal. Risiko relatif kanker kolorektal pada pasien dengan penyakit radang usus telah diperkirakan antara 4- 20 kali lipat.

d. Riwayat Penyakit Kanker Kolorektal atau Adenomatous Polip dari Keluarga

Alasan untuk peningkatan risiko tidak jelas, tetapi mungkin karena gen yang diwariskan, faktor lingkungan bersama, atau kombinasi ini dari dua hal tersebut.

e. Resiko Pewarisan Genetik

Konsekuensi secara turun temurun dengan angka kejadian Sekitar 5 sampai 10% dari kanker kolorektal. Kondisi pewarisan yang paling umum adalah *familial adenomatosa poliposis* (FAP) dan *nonpolyposis hereditary* kanker kolorektal (HNPCC), juga disebut *Lynch syndrome*. Gen yang bertanggung jawab untuk bentuk-bentuk warisan kanker kolorektal telah diidentifikasi. HNPCC adalah terkait dengan mutasi pada gen yang terlibat dalam DNA perbaikan jalur, yaitu gen MLH1 dan MSH2, merupakan mutasi yang bertanggung jawab pada individu dengan HNPCC. FAP disebabkan oleh mutasi pada tumor penekan gen melalui APC.

3. Resiko Faktor Lingkungan

Kanker kolorektal secara luas dianggap sebagai penyakit yang disebabkan oleh lingkungan. Definisi dari lingkungan disini lebih dipersempit kepada pengaruh dari kehidupan sosial dan faktor gaya hidup bagi penderita.

a. Nutrisi

Diet sangat kuat mempengaruhi resiko kanker kolorektal dan mengganti kebiasaan mengonsumsi makanan mampu mengurangi hingga 70% terkena resiko kanker. Diet yang dilakukan adalah diet tinggi lemak, khususnya lemak hewani yang merupakan mayoritas dari faktor penyebab kanker kolorektal. Implikasi dari kelebihan lemak dalam tubuh adalah akan memudahkan bagi perkembangan flora bakteri yang berpotensi sebagai komponen karsinogenik seperti *N-nitrosom*. Mengonsumsi banyak daging juga berimplikasi pada kanker kolorektal. Selain itu, daging yang dimasak dengan suhu tinggi, juga dapat menghasilkan amina heterosiklik dan hidrokarbon aromatik polisiklik, yang dimana kedua zat tersebut dipercaya sebagai zat yang bersifat karsinogenik.

b. Aktivitas fisik dan obesitas

Beberapa gaya hidup berhubungan dengan penyakit kanker kolorektal ini. Kurang dalam melakukan aktivitas dan kelebihan berat badan dilaporkan sebagai faktor keempat penyebab kanker kolorektal. Kurangnya aktivitas fisik dalam rutinitas sehari-hari juga dapat dikaitkan dengan peningkatan kejadian obesitas pada pria dan wanita. Beberapa faktor biologis dapat dikaitkan dengan dialaminya obesitas bagi seseorang, yakni pengaruh pada peningkatan

estrogen dan penurunan sensitivitas insulin dapat mempengaruhi perkembangan kanker.

c. Merokok

Hubungan antara tembakau pada rokok dengan kanker paru-paru telah diketahui sejak dulu. Namun belakangan ini diketahui bahwa ternyata rokok juga berbahaya bagi kolon dan rektum. Angka kejadian telah memperlihatkan bahwa 12 % kematian karena kanker kolorektal disebabkan oleh merokok. Pengaruh dari merokok sangat penting bagi formasi dan pertumbuhan *adenomatus polip* yang dapat mengenali prekursor lesi penyebab kanker kolorektal.

d. Konsumsi Alkohol

Seperti merokok, konsumsi alkohol mungkin terkait dengan peningkatan risiko kanker kolorektal. Konsumsi alkohol adalah faktor dalam timbulnya kanker kolorektal pada usia lebih muda. Metabolit reaktif alkohol seperti asetaldehida dapat bersifat karsinogenik. Ada juga interaksi dengan merokok. Tembakau dapat menyebabkan mutasi spesifik pada DNA yang kurang efisien diperbaiki dengan Kehadiran alkohol di dalam tubuh. Alkohol juga dapat berfungsi sebagai pelarut, meningkatkan penetrasi molekul karsinogenik lainnya dalam sel mukosa.

4. Karsinogenesis

Perubahan genetik yang paling sering terjadi dalam karsinogenesis kanker kolon adalah mutasi *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), *Kristen rat sarcoma* (K-Ras), *small 'mothers against' decapentaplegic4* (SMAD4), *tumor protein p53* (TP53) dan

gen mismatch repair (MMR) yaitu *Mult Homolog 1* (MLH1) dan *Muts homologue 2* (MSH2) (Arends, 2013).

a. Jalur Adenomatous Polyposis Coli (APC)

APC adalah suatu komponen pembentuk sinyal jalur *Drosophila melanogaster wingless gene* (WNT). Sinyal ini memiliki fungsi untuk mengkode sebuah protein yang mengikat bebas mikrotubulus, meningkatkan migrasi dan perlekatan sel, dan mengatur kadar β -katenin. Suatu mediator penting pada jalur sinyal *Drosophila melanogaster wingless gene* (WNT)/ β -katenin. Pembentukan sinyal WNT diperlukan bagi sel-sel induk hematopietik untuk memperbarui diri. WNT memberi sinyal melalui suatu famili reseptor permukaan sel yang disebut *frizzled* (FRZ), dan merangsang beberapa jalur dengan salah satu jalur sentral yang melibatkan β -katenin dan APC (Markowitz and Bertagnolii, 2009).

Mutasi APC ditemukan pada 80% adenoma dan karsinoma dan terjadi di awal rantai urutan karsinogenesis. Mutasi pada protein APC mengakibatkan terjadinya pemotongan protein APC sehingga kemampuannya berubah dan tidak dapat lagi mendegradasi β -katenin, sehingga terjadi penumpukan β -katenin di dalam sitoplasma dan *nucleus* yang mengakibatkan terjadinya WNT signaling pathway secara terus menerus. Inaktivasi APC merupakan jalur utama terbentuknya adenoma (Arends, 2013).

β -katenin membentuk suatu kompleks dengan *T cell transcription factor* (TCF) yang merupakan factor transkripsi di dalam nukelus yang mengakibatkan peningkatan proliferasi sel dengan meningkatkan transkripsi *cellular myc* (*c-MYC*), *SIKLIN D1*, dan gen lain yang menyebabkan poliferasi pada sel (Markowitz and Bertagnolii, 2009).

b. Mutasi *Kirsten rat sarcoma* (K-RAS)

Mutasi yang mengaktivasi *Kirsten rat sarcoma* (K-Ras) ditemukan pada 40% sampai 45% adenoma dan karsinoma kanker kolon dan diduga muncul pada tahapan awal pembentukan adenoma. Mutasi biasanya terjadi pada protein *Kirsten rat sarcoma* (K-Ras) pada posisi kodon nomor 12, 13 dan 61 dan beberapa bagian lain. Protein *Kirsten rat sarcoma* (K-Ras) yang mengalami mutasi memiliki substitusi asam amino yang asli dengan asam amino yang lain yang berpengaruh pada fungsi enzimatis protein *Kirsten rat sarcoma* (K-Ras), yaitu mengurangi atau mencegah pemotongan enzimatis pada ujung gugus fosfat pada guanosin trifosfat (GTP), yang secara normal dapat dikonversikan menjadi guanosin difosfat (GDP) yang merupakan bentuk inaktif.

Gen *Kirsten rat sarcoma* (*K-Ras*) mengalami mutasi akan membentuk protein K-Ras mutan yang teraktivasi secara permanen meskipun tanpa adanya ikatan antara faktor pertumbuhan dengan reseptor di permukaan membrane. *Kirsten rat sarcoma* (*K-Ras*) mutan menimbulkan pertumbuhan dan penyebaran tumor yang terus menerus dan tak terkontrol (Sriwidyani, 2013).

c. Gen *Small 'mothers against' decapentaplegic4* (Smad4) dan *Tumor Suppressor Gene 53* (TP 53)

Gen *Small 'mothers against' decapentaplegic4* (Smad4) mengalami inaktivasi pada 60% sel kanker oleh adanya mutasi atau delesi dalam jumlah banyak pada kromosom 18q tempat gen SMAD4 berada. Smad4 berperan dalam transduksi sinyal pada jalur penghambatan *beta-tumor necrosis factor* (TNF- β), sehingga dengan adanya ketidakmampuan SMAD4 dalam jalur penghambatan tersebut, sel tumor dapat terus tumbuh (Arends, 2013).

Tumor suppressor gene TP53 mengode protein p53 yang merespon pada kerusakan DNA dengan upregulation inhibitor Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor (CDK) p21 yang memperbaiki kerusakan DNA atau dengan upregulation BCL-2 associated X Protein (BAX) dan juga protein apoptosis lain yang menginduksi kematian sel melalui jalur apoptosis. Mutasi yang menginaktivasi fungsi protein p53 ditemukan pada lebih dari 60% kanker kolon dan mutasi ini sering mengakibatkan terjadinya fase akhir yaitu terbentuknya karsinoma (Arends, 2013).

C. WiDr

Colorectal adenocarcinoma cell line (WiDr) merupakan lini sel yang diderivatisasi dari sel kanker kolon manusia (Chen et al., 1987). Sel ini mengekspresikan antigen karsinoembrionik dalam kulturnya. Sel ini memiliki doubling time selama 15 jam dan memiliki efficiency plating 51% (Noguchi, et al., 1979) dan berbentuk polygonal (Gander, et. al., 2013).

Sel WiDr memiliki kelebihan yaitu dapat membentuk tumor histologist mendekati 100% setelah diinokulasikan selama 1-4 minggu pada empat *host* yang berbeda. Sel WiDr juga mudah dikulturkan dan memiliki *doubling time* yang singkat bila dibandingkan dengan kultur sel kanker kolon lainnya. Sel ini juga memiliki *plating efficiency* yang tinggi dan mengekspresikan biomarker yang berguna yaitu *Carcinoembryonik Antigen (CEA)* (Noguchi et al., 1979).

D. Kultur Sel

Kultur sel adalah kultur sel-sel yang berasal dari organ atau jaringan yang telah diuraikan secara mekanis dan atau secara enzimatis menjadi suspensi sel. Suspensi sel tersebut kemudian dibiakkan menjadi satu lapisan jaringan (*monolayer*) di atas permukaan yang keras (botol, tabung dan cawan) atau menjadi

suspensi sel dalam media penumbuh. *Monolayer* tersebut dapat diperbanyak lagi, disebut subkultur atau pasase. Apabila dipasase terus menerus maka dihasilkan sel lestari (*cell line*). Sel lestari memiliki beberapa sifat yaitu (Malole, 1990):

1. Terjadi peningkatan jumlah sel
2. Sel-sel tersebut memiliki daya tumbuh yang tinggi
3. Sel-sel tersebut seragam
4. Biasanya sel-sel tersebut mengalami perubahan fenotipe atau transformasi

Salah satu media untuk pertumbuhan sel kanker adalah RPMI1640. *Roswell Park Memorial Institute Medium*, sering disebut sebagai RPMI, adalah bentuk media yang digunakan dalam kultur sel dan kultur jaringan. Rumus awal cocok untuk pertumbuhan suspensi sel, terutama untuk sel-sel limfoid. Media ini mengandung banyak fosfat dan diformulasikan untuk digunakan dalam 5% atmosfer karbondioksida. RPMI1640, yang paling matang ditingkat media untuk sebagi besar jenis sel, termasuk sel-sel tumor. sel-sel normal, sel kultur primer, sel bagian. RPMI1640 adalah salah satu media yang paling umum digunakan.

E. Toksisitas

Toksisitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu zat untuk menimbulkan kerusakan apabila masuk ke dalam tubuh atau organ yang rentan terhadapnya (Soemitrat, 2009). Toksisitas merupakan suatu sifat relatif dari zat kimia dan sejauh menyangkut diri manusia secara langsung maupun tidak langsung. Toksisitas selalu menunjukkan ke suatu efek berbahaya atau mekanisme biologi tertentu. Toksisitas merupakan istilah relatif yang bisa dipergunakan dalam membandingkan suatu zat kimia lebih toksik dari zat kimia lainnya. Perbandingan antara zat kimia seperti itu sangat tidak informatif, kecuali jika pernyataan itu melibatkan informasi tentang

mekanisme biologi yang sedang dipermasalahkan dan juga dalam kondisi bagaimana zat kimia tersebut berbahaya. Karena itu, pendekatan toksikologi adalah dari segi tentang berbagai efek zat kimia atas berbagai sistem biologi dengan penekanan pada sistem mekanisme efek berbahaya zat kimia itu dan kondisi dimana efek berbahaya itu terjadi.

IC₅₀ merupakan konsentrasi yang menghambat pertumbuhan 50% populasi sel, sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya (Doyle dan Griffiths, 2000). Nilai IC₅₀ dihitung dari kurva linearitas antara log konsentrasi dengan persen viabilitas sel. Data persen viabilitas sel merupakan data rasio yang diperoleh dari konversi masing-masing sumuran dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ sel viabel} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Adanya hubungan linear antara log konsentrasi dengan persen viabilitas sel dapat diketahui dari parameter linieritas, yaitu nilai koefisien korelasi (r) dengan taraf kepercayaan tertentu. (Kusuma et. al., 2010)

Hasil persentasi penghambatan (inhibisi) digunakan untuk menentukan persentasi hidup sel yang akan dipakai untuk menghitung harga IC₅₀ dengan analisa probit. IC₅₀ (*Inhibitor Concentration*) yaitu konsentrasi yang dapat menghambat perkembangbiakan sel sebesar 50% setelah suatu masa inkubasi.

Kuatnya aktivitas antikanker dinyatakan sebagai berikut (Masfria et al, 2015):

1. IC₅₀ 5 µg/mL = sangat aktif;
2. IC₅₀ 5-10 µg/mL = aktif;
3. IC₅₀ 11-30 µg/mL = sedang; dan
4. IC₅₀ > 30 µg/mL = tidak aktif

Taraf toksisitas dapat digunakan untuk menilai toksisitas suatu racun yang sedang diuji coba pada berbagai organisme. Tetapi toksisitas ini sangat beragam bagi berbagai organisme, tergantung dari beberapa faktor antara lain (Soemitrat, 2009) :

1. Spesies uji
2. Cara racun memasuki tubuh
3. Frekuensi dan lamanya paparan
4. Konsentrasi zat pemapar
5. Bentuk, sifat kimia/ fisika zat pencemar
6. Kerentanan berbagai spesies terhadap pencemar

F. Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik adalah uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan dalam evaluasi keamanan obat, kosmetika, zat tambahan makanan, pestisida dan digunakan juga untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Keuntungan penggunaan metode secara *in vitro* adalah (1) dapat digunakan sebagai tahap awal pengembangan suatu obat; (2) hanya dibutuhkan sedikit senyawa uji dalam pengujian; (3) secara drastis mengurangi jumlah hewan laboratorium; (4) untuk berbagai tujuan penggunaan kultur sel primer dari berbagai organ target (liver, ginjal, paru, kulit, sistem saraf dan lainnya) dapat memberikan informasi secara langsung tentang potensi efeknya pada sel target manusia, yang secara ilmiah memberikan hasil yang lebih valid (Doyle and Griffiths, 2000).

Kemampuan sel untuk bertahan hidup dapat diartikan tidak hilangnya kemampuan metabolik atau proliferasi dan dapat diukur dari bertambahnya jumlah sel, meningkatnya jumlah protein atau DNA yang disintesis. Kemampuan sel untuk bertahan hidup inilah yang menjadi dasar uji antikanker (Freshney, 1986).

Sejumlah metode telah dikembangkan dalam studi viabilitas dan proliferasi dari populasi sel. Metode modern yang paling baik telah dikembangkan pada suatu mikropolat (*96-well plates*). Miniaturisasi ini memungkinkan banyak sampel yang dapat dianalisis dengan cepat dan simultan. Bentuk mikropolat juga mengurangi jumlah medium kultur dan sel yang dibutuhkan dengan baik. Pengujian secara kolorimetri memungkinkan sampel diukur secara langsung dalam mikropolat dengan menggunakan alat ELISA (Doyle and Griffiths, 2000).

Metode kuantifikasi sel yang banyak digunakan dalam penelitian antiproliferatif adalah metode *haemocytometer* dan metode MTT.

1. Perhitungan secara langsung (metode *haemocytometer*)

Haemocytometer merupakan perangkat gelas bersama coverslip tipis, terbagi dalam Sembilan area dengan empat area pojok sebagai area menghitung jumlah sel. Ketebalan chamber adalah 0,1 mm dengan kapasitas 10 μL cairan berisi sel dalam area 0,9 mm^3 . Beberapa hal perlu diperhatikan saat menghitung sel dengan *haemocytometer* adalah sel harus tersuspensi rata dan jumlah sel yang minimum yang dihitung adalah seratus. Sel yang melekat perlu ditripsinasi untuk mensuspensikan sel dalam larutan. Tripin blue biasa digunakan untuk membedakan sel hidup dan sel mati. Sel hidup tidak terwarnai, bulat dan relative kecil dibandingkan dengan sel mati. Sedangkan sel mati membengkak dan berwarna biru (Doyle dan Griffiths, 2000)

2. Perhitungan secara tidak langsung dengan metode MTT

Uji MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolium bromide*] didasarkan pada konversi MTT menjadi Kristal formazan oleh sel hidup, yang menggambarkan aktivitas mitokondrial. Karena pada umumnya aktivitas

mitokondrial total dalam suatu populasi sel berhubungan dengan jumlah sel yang hidup, uji ini dipakai secara luas untuk mengukur efek sitotoksik obat secara *in vitro* terhadap suatu sel (Merrlo, et. al., 2011).

Keuntungan penggunaan uji MTT adalah kemampuannya untuk mengukur dalam waktu yang relatif pendek. Bahkan dalam *doubling period* suatu sel dan perbedaan dalam aktivitas metabolisme (Sieuwerts et. al., 1995). MTT adalah garam larut dalam air, bermuatan positif bersifat permeable terhadap membran sel yang dapat diubah menjadi formazan berwarna ungu yang tidak dapat larut dengan pemotongan cincin tetrazolium dengan enzim suksinat dehidrogenase di dalam mitokondria. Produk formazan tersebut bersifat impermeabel terhadap membran sel dan juga terakumulasi dalam sel sehat. Uji MTT telah diuji validitasnya dalam banyak lini/galur sel (Mossmann, 1983). Beberapa bukti terakhir menyimpulkan bahwa reduksi MTT juga dapat diperantarai oleh NADH atau NADPH di dalam sel dan di luar mitokondria (Berridge and Tan, 1992).

Uji *thiazoyl blue tetrazolium bromide* atau uji MTT yang merupakan uji sitotoksitas yang dilakukan secara *in vitro* dilakukan dalam penelitian ini untuk mengetahui kemampuan antikanker ekstrak daun botto'-botto terhadap sel kanker kolon WiDr. Uji ini dipilih karena memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi dari uji sitotoksik lainnya yaitu *lactate dehydrogenase* (LDH) *assay*, *neutral red assay*, dan *protein assay* (Fotakis dan Timbrell, 2005). Hasil uji ini berupa data absorbansi yang menggambarkan viabilitas dari sel yang diuji dan kemudian digunakan untuk menentukan *inhibitory concentration 50* (IC₅₀).

Uji sitotoksik selain uji MTT adalah *lactate dehydrogenase* (LDH) *assay*. Uji ini didasarkan atas deteksi kebocoran *lactate dehydrogenase* pada sel yang mati. Uji

yang lain adalah *neutral red (NR)* dengan prinsip pewarnaan lisosom pada sel hidup, serta uji kandungan protein (*protein assay*) pada sel hidup. Diantara keempat uji sitotoksik tersebut, MTT memiliki sensitivitas yang paling baik (Fotakis and Timbrell, 2005).

G. Ekstraksi

1. Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian atau penarikan komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan, hewan, biota laut dengan pelarut organik tertentu (Dirjen POM, 1986).

2. Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah menarik komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan, hewan dan biota laut dengan pelarut organik tertentu.

3. Mekanisme Ekstraksi

Proses ekstraksi ini didasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel secara osmosis yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara di dalam dan di luar sel, mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif keluar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel (Harbone, 1987).

4. Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi menggunakan pelarut dapat dilakukan secara dingin yaitu maserasi dan perkolasi, dan secara panas yaitu refluks, soxhlet, digesti, infus dan dekokta.

a. Cara dingin

1). Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstraksian dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyarianan maserat pertama dan seterusnya.

2). Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetapan/penampungan ekstrak) yang jumlahnya 1-5 bahan.

b. Cara Panas

1). Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur dan waktu tertentu serta jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.

2). Soxhletasi

Soxhletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

3). Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40°-50°C.

4). Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infuse tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96°-98°C) selama waktu tertentu 15-20 menit.

5) Dekokta

Dekokta adalah infusa pada waktu yang lebih lama (30 menit) dan temperature sampai titik didih air (Dirjen POM, 1986).

H. Uraian Tumbuhan

1. Klasifikasi tumbuhan Botto'-Botto' (*The Plants Database*, 2000)

Regnum : Plantae
 Super Divisi : Spermatophyta
 Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Dicotyledoneae
 Sub Kelas : Asteridae
 Ordo : Asterales
 Family : Asteraceae
 Genus : *Chromolaena*
 Spesies : *Chromolaena odorata* (L.)

2. Nama daerah

Chromolaena odorata (L.) dikenal di Indonesia dan negara lain dengan nama yang berbeda. Di Makassar khususnya, spesies ini dikenal dengan beberapa nama,

seperti Botto'-Botto', Laruna, dan Gondrong-Gondrong. Beberapa daerah lain misalnya, memiliki nama tersendiri, Kopasanda di Maros, Ki Rinyuh di Sunda, Tekelan di Jawa, *Siam Weed* atau *Jack in the Bush* di Inggris (Prawiradiputra, 2006).

3. Morfologi

Tumbuhan Botto'-botto' memiliki bentuk daun oval dan bagian bawahnya lebih lebar, makin ke ujung makin runcing. Panjang daun 6-10 cm dan lebarnya 3-6 cm. Tepi daun bergerigi, menghadap ke pangkal, letaknya berhadapan. Karangan bunga terletak di ujung cabang (terminal), dan setiap karangan terdiri atas 20-35 bunga. Warna bunga pada saat muda kebiruan, semakin tua menjadi coklat. Waxyu berbunga seretntak pada musim kemarau selama 3-4 minggu. Pada saat biji masak, tumbuhan mengering kemudian bijinya pecah dan terbang terbawa angin. Kurang lebih satu bulan setelah awal musim hujan, potongan batang, cabang, dan pangkal batang akan bertunas kembali. Biji-biji yang jatuh ke tanah juga mulai berkecambah sehingga dalam waktu dua bulan berikutnya, kecambah dan tunas-tunas telah terlihat mendominasi suatu area. (Prawiradiputra, 2007)

Botto'-botto' dapat tumbuh pada ketinggian 1.000-2.800 m dpl, sedangkan di Indonesia banyak ditemukan di dataran rendah (0-500 m dpl). Tinggi tumbuhan dewasa dapat mencapai lebih dari 5 m (Departmen of Natural Resources, Mines dan Water, 2006). Batang muda agak lunak dan berwarna hijau, kemudian berangsur-angsur menjadi cokelat dan keras (berkayu) apabila sudah tua. Letak cabang biasanya berhadap-hadapan dan jumlahnya sangat banyak. Cabangnya yang rapat menyebabkan cahaya matahari yang masuk ke bagian bawah berkurang, sehingga menghambat pertumbuhan spesies lain, termasuk rumput yang tumbuh di bawahnya. (Thamrin et. al., 2013)

4. Kandungan Kimia

Skrining fitokimia pada sampel daun botto'-botto' yang dilakukan oleh Harbone (1973) dan Sofowora (1980). Mereka menyaring beberapa senyawa kimia kelompok pada sampel, berupa alkaloid, glikosida sianogen, flavonoid (auron, kalcon, flavon, and flavonol), fitat, saponin, dan tanin. Determinasi kuantitatif pada senyawa fitat, saponin, dan tanin dipublikasi dengan metode relevan oleh Asosiasi Kimia Analisis Resmi tahun 2006.

Spackman et. al. (1985) menemukan asam amino dari botto'-botto', dengan melakukan serangkaian metode yaitu dengan mengeringkan daun botto'-botto' hingga bobotnya konstan, dibebas-lemakkan, dihidrolisis, lalu dievaporasi hingga diproses lebih lanjut dalam Aplikator Teknisi Multi-sampel dari Analitik Asam Amino (Ngozi, 2009).

Kandungan nitratnya yang tinggi (lima hingga enam kali di atas kadar toksik) dapat menyebabkan aborsi bahkan kematian ternak serta dapat meracuni daun dan tunas muda tanaman kebun (Akinmoladun et. al., 2007).

5. Kegunaan

Dilaporkan oleh Ngozi (2009) bahwa dalam pengobatan tradisional, botto'-botto' digunakan sebagai bahan alam yang berkhasiat antispasmodik, antiprotozoa, antibakteria, antifungi, antihipertensi, antiinflamasi, astringen, antitripanosoma, diuretik dan bahan hepatotropik.

Senada dengan laporan Ngozi, Vital (2009) juga turut menyebutkan khasiat terapeutik dari botto'-botto' seperti antidiare, antispasmodik, astringen, antihipertensi, antiinflamasi, dan diuretik. Penggunaan daunnya yang dibuat dalam dekokta

dimanfaatkan sebagai obat batuk atau bila dicampurkan rumput lemon dan daun jambu biji berkhasiat mengobati penyakit malaria.

Botto'-botto' memberikan keuntungan bagi pertanian, khususnya tanaman pangan. Di India, gulma ini dimanfaatkan untuk meningkatkan hasil berbagai jenis tanaman pangan, seperti kedelai, *cluster bean*, *radish*, palak dan ragi yang tumbuh di sana (Prawiradiputra, 2007)

I. Tinjauan Islam mengenai riset dan pengobatan

Kehidupan manusia begitu kompleks akan terasa mudah dan ringan bila umat manusia berpegang teguh pada ajaran agama Islam. Peradaban Islam dikenal sebagai perintis dalam bidang farmasi. Para ilmuwan Muslim pada kejayaan Islam sudah berhasil menguasai riset ilmiah mengenai komposisi, dosis, penggunaan, dan efek dari obat-obat sederhana dan campuran. Selain menguasai bidang farmasi, masyarakat muslimpun tercatat sebagai peradaban pertama yang memiliki apotek atau toko obat (Masood, 2009).

Terkait dengan riset ilmiah, Allah Swt telah menerangkan dalam Al-qur'an surah Al-Alaq/96: 1-5

أَقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ ۝ ١ خَلَقَ الْإِنْسَانَ مِنْ عَلَقٍ ۝ ٢ أَقْرَأْ وَرَبُّكَ
الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ ۝ ٣ عَلَّمَ الْإِنْسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ ۝ ٥

Terjemahnya:

Bacalah dengan (menyebut) nama Tuhanmu yang menciptakan. Dia telah menciptakan manusia dari segumpal darah. Bacalah, dan Tuhanmulah Yang Mahamulia. Yang mengajar manusia dengan pena. Dia mengajarkan manusia apa yang diketahuinya. (Kementrian Agama, 2013).

Dari ayat tersebut, Allah memerintahkan manusia membaca (mempelajari, meneliti, dan sebagainya) apa saja yang telah Ia ciptakan, baik ayat-ayatNya yang tersurat (*qauliyah*), yaitu Al-Qur'an, dan ayat-ayatNya yang tersirat, maksudnya alam

semesta (*kauniyah*). Membaca itu harus dengan nama-Nya, artinya karena Dia dan mengharapkan pertolongan-Nya. Dengan demikian, tujuan membaca dan mendalami ayat-ayat Allah itu adalah diperolehnya hasil yang diridai-Nya, yaitu ilmu atau sesuatu yang bermanfaat bagi manusia (Kementrian Agama, 2009).

Sebagai kesimpulan dari tafsir di atas yaitu bahwa umat manusia, apalagi umat Islam, harus mengembangkan kemampuan baca tulis untuk memahami seluruh ayat Allah, baik *qauliyah* maupun *kauniyah*. Membaca dan mendalami ayat-ayat Allah harus karena Dia dan dengan meminta bantuan-Nya, supaya ilmu yang dihasilkan bermanfaat bagi manusia. Membaca atau meneliti ayat-ayat itu harus dilakukan berkali-kali, artinya secara terus-menerus, supaya terus-menerus pula meningkatkan penguasaan ilmu pengetahuan.

Obat setiap penyakit itu diketahui oleh orang yang ahli di bidang pengobatan, dan tidak diketahui oleh orang yang bukan ahlinya. Oleh karena itu Allah Swt menghendaki agar pengobatan itu dipelajari oleh ahlinya agar sesuai dengan penyakit yang akan diobati sehingga akan mendorong kesembuhan. Sebagaimana tertera dalam surah asy-Syu'ara/26 : 80

وَإِذَا مَرِضٌ ۖ فَهُوَ يَشْفِي ۚ ٨٠

Terjemahnya :

“Dan apabila aku tertimpa sakit, maka Dialah yang menyembuhkan ”
(Kementrian Agama, 2013).

Firman-Nya: wa idzâ maridhu/ dan apabila aku sakit berbeda dengan redaksi lainnya. Dalam hal penyembuhan seperti juga dalam pemberian hidayah, makan, dan minum secara tegas beliau menyatakan bahwa yang melakukannya adalah Dia, Tuhan semesta alam itu (Shihab, 2002).

Ayat tersebut menjelaskan kepada manusia untuk terus berusaha meski yang menentukan hasilnya adalah Allah swt. Seperti halnya dalam dunia kesehatan, jika suatu penyakit menyerang kita dianjurkan untuk mencari pengobatan apakah itu menggunakan obat tradisional maupun obat sintetik karena berobat adalah salah satu bentuk usaha mencapai kesembuhan (Masood, 2009).

Dari Abu Hurairah Radhiyatullahu Anhu bahwa Rasulullah saw bersabda:

أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا

Artinya:

Dari Jabir bin Abdillah; bahwa Rasulullah bersabda, “*Setiap Penyakit ada obatnya. Jika sesuai antara penyakit dan obatnya, maka akan sembuh dengan izin Allah*” (H.R. Imam Muslim 2204)

Hadist tersebut menjelaskan bahwa semua penyakit memiliki obat, dan obat yang diberikan sesuai dengan penyakitnya. Oleh karena itu manusia harus senantiasa berusaha dan mencari tahu, meneliti obat untuk memperoleh pengobatan yang sesuai. Namun, tidak lupa bahwa kesembuhan dari suatu penyakit hanya karena izin Allah swt.

Dalam pengobatan Islam, dianjurkan untuk tidak melakukan pengobatan yang membawa kemudharatan dan menimbulkan masalah baru seperti merusak tubuh. Terlebih bila pengobatan tersebut bisa mengakibatkan pelakunya jatuh dalam jurang kekafiran. Oleh karena itu, dalam kitab Thibbun Nabawi dianjurkan semampunya umat manusia menjaga kesehatan tubuh secara jasadi dan rohani dengan berpegang teguh pada tuntutan syariat Islam dan landasan normatif (Yazid, 2011).

Tumbuhan yang bermacam-macam jenisnya dapat digunakan sebagai obat penyakit dan merupakan anugrah Allah swt, karena Allah swt tidak memberi penyakit tanpa disertai dengan obat (penyembuhannya). Inilah yang harus manusia pelajari dan manfaatkan.

Hal tersebut sinergis dengan firman Allah swt dalam surah asy-Syu'ara/26:7

أَوْ لَمْ يَرَوْا إِلَىٰ آلِ الْأَرْضِ كَمْ أَنَبَّتْ نَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝٧

Terjemahnya:

Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi berbagai macam pasangan (tetumbuhan) yang baik?

(Kementrian Agama, 2013).

Kata إِلَىٰ ke pada firman-Nya di awal ayat ini: *أَوْ لَمْ يَرَوْا إِلَىٰ آلِ الْأَرْضِ* apakah mereka tidak melihat ke bumi merupakan kata yang mengandung makna batas akhir. Ia berfungsi memperluas arah pandangan hingga batas akhir. Dengan demikian, ayat ini mengundang manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya sampai seantero bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya dan aneka keajaiban yang terhampar pada tumbuh-tumbuhannya.

Kata زَوْجٍ berarti pasangan. Pasangan yang dimaksud ayat ini adalah pasangan tumbuh-tumbuhan karena tumbuhan muncul di celah-celah tanah yang terhampar di bumi. Dengan demikian, ayat ini mengisyaratkan bahwa tumbuh-tumbuhan pun memiliki pasang-pasangan guna pertumbuhan dan perkembangannya. Yang jelas, setiap tumbuhan memiliki pasangannya dan itu dapat terlihat kapan saja bagi siapa yang ingin menggunakan matanya. Karena itu, ayat di atas memulai dengan pertanyaan apakah mereka tidak melihat, pertanyaan yang mengandung unsur keheranan terhadap mereka yang tidak mengfungsikan matanya untuk melihat bukti yang sangat jelas itu (Shihab, 2002)

Lebih lanjut disebutkan pula dalam QS al- An'am/6: 99

وَهُوَ الَّذِي أَنزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجَ نَا بِهِ نَبَاتٍ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجَ نَا مِنْ هَا خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْ هَا حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ لَمِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشَبَّهًا

وَعَيَّرَ مُتَشَبِهًا أَنْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكُمْ لَآيَاتٍ
لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ٩٩

Terjemahnya:

“Dan Dialah yang menurunkan air dan langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan, maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang kurma, mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya pada waktu berbuah, dan menjadi masak. Sungguh, pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.” (Kementerian Agama, 2013).

Ayat ini menguraikan hal-hal yang disebutkan di atas, bermula dengan menegaskan bahwa dan Dia yaitu Allah swt yang telah menurunkan air dalam bentuk hujan dari langit, lalu Kami yakni Allah swt menumbuhkan tumbuh-tumbuhan disebabkan olehnya yakni akibat turunnya air itu, maka Kami keluarkan darinya, yakni dari tumbuh-tumbuhan itu, tanaman yang menghijau.

Untuk lebih menjelaskan kekuasaan-Nya ditegaskan lebih lanjut bahwa, Kami keluarkan darinya, yakni dari tanaman yang menghijau itu, butir yang saling bertumpuk, padahal sebelumnya ia hanya satu benih.

Lebih dari itu, ayat ini menerangkan bahwa air hujan adalah salah satu sumber air bersih bagi tanah. Sedangkan matahari adalah sumber semua kehidupan. Tetapi, hanya tumbuh-tumbuhan yang menjadi produsen dalam rantai makanan yang dapat memanfaatkan sinar matahari untuk kemudian membentuk bahan makanan organik dan oksigen yang akan dimanfaatkan oleh makhluk hidup lainnya.

Di bagian akhir ayat ini disebutkan: perhatikan buahnya di waktu (pohonnya) berbuah dan kematangannya. Perintah ini mendorong perkembangan Ilmu Tumbuh-tumbuhan (Botanik) yang sampai saat ini mengandalkan metode pengamatan bentuk luar seluruh organnya dalam semua fase perkembangannya.

Ayat 99 ini ditutup dengan **لَقَوْلِهِمْ إِنَّا كَاشِفُ الْعَذَابِ عَنْهُمْ إِنْ كَانُوا مُوقِنِينَ** bagi kaum yang beriman, ia ditutup sebagai syarat bahwa ayat-ayat ini atau tanda-tanda itu hanya bermanfaat untuk yang beriman (Shihab, 2002).

Dari kedua ayat tersebut dapat ditarik pemahaman bahwa Allah swt memberi sebuah legalitas dan bersifat perintah pada manusia untuk memperhatikan bumi, yang dapat diartikan sebagai upaya untuk senantiasa mengkaji, meneliti, hingga menemukan hasil yang berupa manfaat dan kegunaan dari tumbuhan yang ada.

Konsep pengobatan dalam islam adalah menggunakan obat yang halal dan baik. Ada hal yang penting dari apa yang disampaikan Rasulullah saw, bahwa tidak mungkin obat-obat yang digunakan seseorang adalah sesuatu yang haram, karena pastinya ketika Allah menciptakan suatu penyakit, Allah juga menurunkan obatnya, namun karena Allah Maha Suci (al-Quddus), tidaklah mungkin Allah akan menurunkan penawarnya dari benda yang haram.

Hal ini patut menjadi perhatian, karena perihal halal haram menjadi satu hal yang sangat penting dalam Islam yang bisa membuat amalan seseorang tidak diterima oleh Allah swt karena permasalahan obat yang diminum. Selain itu, suatu obat selain halal juga baik, antara lain tidak membawa mudharat yang akan mencacatkan tubuh atau berbau takhayul, bid'ah, dan khurafat.

Islam sangat menghargai bentuk-bentuk pengobatan yang didasari oleh ilmu pengetahuan, penelitian, dan eksperimen ilmiah. Oleh karena itu setiap pengobatan hendaklah ditangani oleh para ahlinya.

Dalam penelitian ini, ditemukan spesies tanaman botto'-botto' (*Chromolaena odorata*) yang diduga sebagai obat antikanker yang nantinya dapat dimanfaatkan oleh manusia.

Dikenal beberapa cara pengobatan dalam Islam untuk menyembuhkan penyakit. Diantaranya, penyembuhan dengan air, bekam, do'a, dan obat-obat tradisional.

Di samping itu, bahan-bahan tradisional juga bisa digunakan sebagai obat. Karena memang sudah turun-temurun digunakan oleh masyarakat dan biasa dimanfaatkan dalam kehidupan rumah tangga.

Semua yang diciptakan Allah swt memiliki manfaat, termasuk tumbuhan-tumbuhan. Untuk Pemanfaatan tumbuhan tersebut, diperlukan ilmu dan pengalaman (teoritis dan empiris) dengan penelitian dan eksperimen. Salah satunya dalam pemanfaatannya sebagai obat.

Bila dilihat kembali tentang hukum mempelajari ilmu pengobatan tradisional bahwa para ahli pengobatan tradisional dari masa ke masa telah melakukan eksperimen terhadap obat-obatan. Mereka merujuk dari berbagai buku medis yang disusun oleh para pakar pengobatan. Ini termasuk satu cabang ilmu diantara berbagai ilmu yang sangat banyak. Sekelompok orang memang ada yang menjadi tenaga ahli dalam pengobatan semenjak masa kenabian, juga sebelum itu dan sesudahnya.

Mereka mengetahui formula obat-obatan dan penggunaannya. Diiringi dengan keyakinan bahwa obat itu hanya penyebab perantara kesembuhan saja, sebab Allah yang menjadikan (kesembuhan) semua itu. Oleh karena itu, hukumnya boleh mempelajari ilmu pengobatan tradisional dan berobat dengannya.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Lokasi Penelitian

1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu menggunakan analisis eksperimental untuk uji toksisitas senyawa aktif dari bahan alam untuk mencari obat baru secara *in vitro*.

2. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar dan Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

B. Pendekatan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah botol duran 100 ml, *conical tube*, *counter*, *culture dish*, desikator, ELISA *plate reader* (Benchmark[®]), *hemocytometer* (Neubauer[®]), Inkubator CO2 5% (Heraeus[®]), kamera digital, kulkas, Laminar air flow (Labconco[®]), mikropipet 1 ml, mikropipet 20µl, 200µl dan 1000µl (Gilson[®]), mikroplate 96-well (IWAKI[®]), mikroskop inverted (Olympus[®]), oven, pipet pasteur, pompa vakum, rak tabung, *rotary evaporator* (Heidolph[®]), sentrifuge, stiker label, syringe filter 0,2 µm, tabung eppendorf, tabung falcon 15 ml dan 50 ml, tabung konikal steril, tabung reaksi kecil, timbangan analitik (sartorius[®]), Tip 100 µl dan

1000 μ l, vortex (Barnstead[®]), waterbath, dan alat-alat gelas serta alat praktikum penunjang lain.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah aluminium foil, amphotericin B 0,5%, daun botto'-botto', DMSO, etanol 70%, HCl, n-heksan, Hepes (N-2-hydroxyethylpiperazine-2-ethanesulfonic acid), media RPMI 1640 dengan foetal bovine serum (FBS) 10%, methanol, MTT {[3-(4,5-dimetil tiazol 2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromida]}, Natrium bikarbonat (NaHCO_3), PBS, penisilin-streptomisin 1%, sel kanker WiDr, *Silica gel*, Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), Tritisin-EDTA (0,25%).

D. Metode Kerja

1. Pengolahan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun botto'-botto' yang segar, dicuci bersih dengan air mengalir kemudian dipotong-potong kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, tidak terkena paparan sinar matahari langsung. Kemudian dilakukan ekstraksi berupa maserasi.

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu secara maserasi. Dimana maserasi merupakan metode yang paling mudah dilakukan dan menggunakan peralatan yang sederhana, yaitu dengan cara merendam sampel dalam cairan penyari. Cairan penyari yang digunakan adalah n-heksan.

Sampel daun botto'-botto' yang sebelumnya telah dikeringkan, ditimbang sebanyak 300 gram dimasukkan dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan dengan cairan penyari pertama yaitu n-heksan hingga semua sampel terendam keseluruhan dan ditutup rapat. Dibiarkan selama 2 kali 24 jam sambil diaduk sekali-

kali. Disaring dan dipisahkan filtratnya.. Ekstrak n-heksan yang diperoleh dipekatkan dengan alat *rotary evaporator*, didapatkan ekstrak kental n-heksan.

2. Pembuatan Media Kultur

Dilarutkan bubuk RPMI ke dalam 800 ml akuades, kemudian ditambahkan 2 gram *4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazineethanesulfonic acid* (HEPES) dan 2 gram NaHCO_3 . Ditambahkan akuades sampai volume 1 L. Campuran dihomogenkan dengan cara diaduk kemudian pH diukur pada 7,2-7,4 dengan cara penambahan 1M NaOH atau 1M HCl. Sterilisasi dilakukan dengan cara menyaring menggunakan saringan membran 0,2 μm , selanjutnya ditambahkan fungtion 0,5%, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, dan streptomisin 1%. Ditampung ke dalam botol duran.

3. Penanaman Sel

Mula-mula dilakukan panen sel. Diambil sel dari tangki nitrogen cair, amati kondisi sel. Panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen. Dibuang media dengan menggunakan mikropipet. Dicuci sel sebanyak 2 kali dengan PBS (volume PBS adalah $\pm \frac{1}{2}$ volume media awal). Ditambahkan tripsin-EDTA (tripsin 0,25%) secara merata dan diinkubasi di dalam inkubator selama 3 menit. Ditambahkan media ± 5 ml untuk menginaktifkan tripsin. Diamati keadaan sel di mikroskop. Ditransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam conical steril baru. Resuspensi sel di conical tube dari hasil panen. Diambil 10 μl panen sel dan dipipetkan ke haemocytometer. Dihitung sel di bawah mikroskop inverted dengan bantuan counter. Dilakukan transfer sejumlah sel yang diperlukan ke dalam conical lain dan ditambahkan media komplit sesuai konsentrasi yang dibutuhkan. Jika sudah siap, ditransfer sel ke dalam sumuran, masing-masing 100 μl . Sisakan 4 sumuran kosong untuk kontrol media.

Diamati keadaan sel di mikroskop inverted untuk melihat distribusi sel dan didokumentasikan. Diinkubasi 24 jam.

4. Preparasi Sampel dan *Treatment*

Larutan Uji dibuat dengan melarutkan 10 mg ekstrak n-heksan botto' botto' dalam 100 μ l DMSO sehingga diperoleh stok 1000 ppm. Dari larutan stok dibuat seri konsentrasi 1000 μ g/ml; 500 μ g/ml; 250 μ g/ml; 125 μ g/ml; dan 62,5 μ g/ml dalam media kultur RPMI untuk uji sitotoksik. Pekerjaan ini dilakukan di LAF. Diambil plate dari inkubator CO₂ untuk dibawa ke LAF. Dibuang media sel (balikkan plate 180°) di atas tempat buangan dengan jarak 10 cm, kemudian tekan plate secara perlahan di atas tisu untuk meniriskan sisa cairan. Dimasukkan seri konsentrasi sampel ke dalam sumuran (triplo). Inkubasi di dalam inkubator CO₂ selama 24 jam.

5. Uji Sitotoksik MTT

Menjelang waktu akhir inkubasi, dokumentasikan kondisi sel untuk setiap perlakuan (foto dahulu). Buang media sel, tambahkan reagen MTT 100 μ l ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Inkubasi sel selama 2-4 jam di dalam inkubator (sampai terbentuk formazan). Periksa kondisi sel dengan mikroskop inverted. Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan stopper SDS 10% dalam 0,1 N HCl. Pekerjaan tidak perlu dilakukan di dalam LAF hood. Bungkus plate dengan kertas atau aluminium foil dan inkubasikan di tempat gelap (suhu ruangan) semalam (jangan diiletakkan di inkubator!). Selanjtnya pembacaan absorbansi, hidupkan ELISA reader, tunggu proses progressing hingga selesai. Buka pembungkus plate dan tutup plate. Masukkan ke dalam ELISA reader (posisi jangan terbalik). Baca absorbansi masing-masing sumuran dengan ELISA reader pada panjang gelombang

595 nm tekan tombol *START*. Matikan ELISA reader. Simpan dan tempel kertas hasil ELISA pada LOG BOOK.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Hasil Ekstraksi Daun Botto'-Botto'

Tabel 1. Hasil Perhitungan Rendemen

Berat Sampel	Berat Ekstrak	% Rendemen
300 gram	500 mg	0.16 %

2. Uji Sitotoksik WiDr

Tabel 2. Hasil Uji Sitotoksik Metode MTT Sel WiDr

Konsentrasi	Log Konsentrasi	% Inhibisi	Nilai Probit	Persamaan Regresi	IC ₅₀
1000	3	97,9	7,0335	$Y = 3,022x - 1,686$ $R^2 = 0,913$	162,18 µg/ml
500	2,6989	98,3	7,1204		
250	2,3979	69,6	5,5129		
125	2,0969	21,3	4,2039		
62,5	1,7958	14,5	3,9419		

B. Pembahasan

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan mekanisme tidak normal dan tidak terkontrol pada pengaturan kelangsungan hidup, proliferasi dan diferensiasi sel. Jika penyebaran kanker tidak terkontrol maka dapat menyebabkan kematian (Hondermarck, 2003).

Kanker kolon merupakan salah satu penyakit yang banyak mengakibatkan kematian. Usaha penyembuhan kanker kolon melalui pembedahan kemoterapi dan radioterapi pada umumnya belum mampu memberikan hasil yang efektif. Hal ini mengakibatkan banyak dijumpai cara pengobatan alternatif antara lain

menggunakan bahan dari alam. Salah satu bahan yang berpotensi sebagai anti kanker berdasarkan beberapa temuan sebelumnya adalah daun botto'-botto'.

Sampel yang digunakan dalam pengujian sitotoksik ini terlebih dahulu melalui suatu proses yang dinamakan ekstraksi dimana sejumlah 300 gram simplisia daun botto'-botto' diekstraksi menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut n-heksan sebanyak 4 liter (dilakukan dua kali), menghasilkan ekstrak kental daun botto'-botto' sebanyak 500 mg. Jumlah persentase rendemen yang diperoleh dari ekstrak n-heksan daun botto'-botto' adalah 0,16 %.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak n-heksan daun botto'-botto' dan menentukan nilai *fifty Percent Inhibitory concentration*, yaitu konsentrasi suatu senyawa yang bisa menghambat pertumbuhan sel sebesar 50%. Pengujian toksisitas dengan menggunakan sampel n-heksan daun botto'-botto' telah diteliti potensinya sebagai antikanker dalam penelitian dengan metode yang berbeda yaitu BSLT dan Antimitosis Bulu Babi dengan IC₅₀ yang diperoleh 10,91 µg/ml dan 11,85 µg/ml.

Uji sitotoksik terhadap sel kanker merupakan pengujian dasar yang umum pada obat antikanker maupun senyawa kemopreventif. Melalui parameter IC₅₀, dapat dilihat potensi toksik senyawa/bahan yang diujikan. Salah satu metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksitas secara in vitro adalah metode MTT. Sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel kanker kolon WiDr. Sel WiDr merupakan sel epitel yang diisolasi dari kolon seorang wanita berusia 78 tahun (Chen et al., 1987). Sel ini ditumbuhkan pada media RPMI dengan suhu 37°C, dapat tumbuh secara kontinyu dan menempel pada flask.

Untuk pengujian sitotoksik mula-mula ekstrak daun botto'-botto' ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan menggunakan pelarut DMSO sebanyak 100 μ l, sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 100 μ g/ml. Dalam uji ini digunakan pelarut DMSO karena merupakan pelarut yang baik untuk ion anorganik maupun senyawa organik (Fessenden and Fessenden, 1992). DMSO sendiri mempunyai sifat sitotoksik pada konsentrasi tertentu tapi pada konsentrasi rendah DMSO relatif tidak memberikan pengaruh pada pertumbuhan sel. Penggunaan DMSO sebagai pelarut dalam berbagai konsentrasi relatif tidak berpengaruh pada *cell viability* T47D (Nurulita, 2005). Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini, kematian sel ataupun penghambatan pertumbuhan sel bukan akibat pengaruh DMSO melainkan karena pengaruh sampel uji yang digunakan dalam penelitian. Larutan uji dibuat dengan konsentrasi 1000; 500; 250; 125 dan 62,5 μ g/ml.

Panen sel adalah prosedur dimana sel yang telah ditumbuhkan dalam media yang mengandung 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebagai sumber nutrisi, penisilin-streptomisin 0,25 % sebagai anti bakteri, amphotericin B 0,5% sebagai anti jamur, dan media RPMI dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan aliran 5% CO₂, yang dipindahkan ke conical tube. Jadi, ketika sel telah konfluen (sel yang sudah berkembang dan dapat dipanen) selanjutnya dilepas dari *plate tissue culture* dengan teknik tripsinasi, yaitu sel dicuci dengan PBS 2-3 kali untuk menghilangkan media penumbuh yang sebelumnya ada dalam *plate* karena salah satu kandungan sel yang dipanen yaitu FBS dapat menghentikan kerja tripsin. Tripsin 0,025% sebanyak 1 ml ditambahkan untuk melepaskan sel yang melekat pada *plate* karena sel WiDr merupakan sel yang memiliki sifat lekat kuat

pada *plate*. Selama 10 menit didiamkan dalam inkubator untuk memaksimalkan kerja tripsin, kemudian diamati sel yang lepas di bawah mikroskop. Sel yang lepas dipindahkan ke dalam tabung *conical tube* 15 ml, ditambahkan 5 ml media komplit (FBS 10%, amphotericin B 0,5%, penstrep 0,25% dan media RPMI) untuk memberikan nutrisi bagi sel dan menghindarkan dari kontaminan. Diambil 10 μ l dimasukkan ke dalam *haemocytometer* untuk mengetahui jumlah sel yang ada dalam 1 ml. Penghitungan sel pada saat pemanenan dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer* dan dilihat di bawah mikroskop. Sel yang sehat ditandai dengan sel berbentuk bulat, berinti, dilindungi oleh dinding sel yang jernih dan bersinar di bawah mikroskop. Sedangkan sel yang mati tampak gelap dengan inti sel yang rusak. Jumlah sel yang digunakan adalah 5×10^3 sel tiap sumuran.

Setelah dihitung jumlah sel dibuat pengenceran 100.000 sel yaitu 100 μ l sel dalam 10 ml media komplit. Suspensi sel dalam media komplit sebanyak 100 μ l dimasukkan pada *microplate* 96 sumuran untuk ditumbuhkan lalu diinkubasi selama 24 jam dengan tujuan agar sel bisa beradaptasi dan menempel pada dasar plate. Setelah inkubasi, ditambahkan larutan uji setiap ekstrak dengan konsentrasi 1000 μ g/ml; 500 μ g/ml; 250 μ g/ml; 125 μ g/ml dan 62,5 μ g/ml masing-masing sebanyak 100 μ L dengan 3 replikasi. Selanjutnya media komplit sebanyak 100 μ L ditambahkan pada 4 sumuran yang lain yang berisi sel sebagai kontrol sel dan 4 sumuran dibiarkan kosong sebagai blanko lalu diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam untuk mengetahui efek senyawa terhadap penghambatan pembelahan sel WiDr. Setelah inkubasi selama 24 jam, tampak banyak kematian sel WiDr karena perlakuan sampel ekstrak n-heksan daun

botto'-botto' dan dapat dilihat dari perubahan morfologi pada sel. Pada pengamatan di bawah mikroskop sel hidup tampak menempel di dasar plate dan berwarna terang, sedangkan sel mati terlepas dari dasar plate dan berwarna gelap.

Selanjutnya pada masing-masing sumuran, ditambahkan 100 μ L larutan MTT, dimana MTT akan diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan. Sel diinkubasi kembali selama 4 jam dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37°C untuk memaksimalkan kerja MTT.

MTT adalah reagen yang digunakan dengan tujuan untuk memudahkan pengamatan dalam penghitungan sel yang hidup. Reagen MTT merupakan garam tetrazolium yang sifatnya larut dalam air dengan menghasilkan larutan berwarna kuning. Prinsip dasarnya adalah kerja enzim mitokondria pada sel aktif yang memetabolisme garam tetrazolium, sehingga terjadi pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase yang menyebabkan tetrazolium berubah menjadi formazan yang tidak larut dalam air tapi larut dalam SDS 10 % dan berwarna ungu (Mostmann, 1983).

Intensitas warna ungu ini mempunyai korelasi langsung dengan jumlah sel yang hidup. Sedangkan sel yang mati tidak akan terpengaruh oleh reagen MTT karena mitokondrianya tidak berespirasi sehingga cincin tetrazolium tidak terputus maka tidak akan terbentuk formazan yang berwarna ungu, tetapi warnanya tetap kuning.

Reaksi MTT dihentikan dengan menambahkan SDS 100 μ L untuk memecah kristal formazan yang terbentuk dan memberikan warna ungu, diinkubasi dalam suhu kamar dengan keadaan terbungkus kertas yang menutupi

seluruh permukaan *microplate* selama semalam untuk memaksimalkan aksi reagen stopper dan mencegah oksidasi MTT dengan adanya cahaya. Penghentian reaksi antara reagen MTT dengan sel yang hidup yaitu dengan penambahan SDS 10% dalam HCl 0,1 N yang dapat mendenaturasi protein menjadi unit polipeptida dan membentuk kompleks SDS polipeptida. SDS 10 % dapat melarutkan kristal formazan hasil dari reaksi MTT dan tidak menyebabkan pengendapan. SDS yang digunakan sebanyak 10% karena kristal formazan tidak larut sempurna jika digunakan SDS kurang dari 5 % dan mudah larut pada suhu 37°C (Tada et al, 1986).

Serapan dibaca dengan *microplate* ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Digunakan panjang gelombang 595 nm karena pada panjang gelombang tersebut diperoleh pengukuran yang optimum sehingga akan diperoleh data yang peka dan spesifik. Semakin kuat intensitas warna ungu yang terbentuk, akan diperoleh absorbansi yang semakin besar pula. Hal ini menunjukkan semakin banyak sel hidup yang bereaksi dengan garam tetrazolium, maka terbentuk formazan yang banyak pula.

Pada metode MTT, persentase kematian sel merupakan selisih absorbansi kontrol dengan absorbansi sampel dibagi absorbansi kontrol dikalikan 100 %. Data diolah dengan menggunakan analisis Probit untuk mendapatkan nilai IC_{50} sampel. Nilai IC_{50} menunjukkan persentase kematian sel pada kultur sebanyak 50%.

Hasil yang didapatkan pada pengujian menggunakan kultur sel WiDr untuk ekstrak n-heksan daun botto'-botto' dengan konsentrasi 1000 µg/ml; 500 µg/ml; 250 µg/ml; 125 µg/ml dan 62,5 µg/ml dengan nilai persentase inhibisi

berturut-turut sebagai berikut 97,9%; 98,3 %; 69,6 %; 21,3 % dan 14,5 %. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dari sampel uji yang diberikan maka semakin kecil persentase kehidupan sel kanker dan semakin besar sifat toksisitasnya.

Berdasarkan pengolahan data yang telah dilakukan dengan metode analisis probit diperoleh nilai IC_{50} untuk sel WiDr dari pengujian menggunakan ekstrak n-heksan daun botto'-botto' adalah 162,18 $\mu\text{g/ml}$. Penetapan batas toksik penelitian ini menggunakan kriteria *National Cancer Institute* (NCI). Kriteria ini menyebutkan suatu ekstrak dinyatakan aktif memiliki aktivitas antikanker apabila memiliki nilai $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$, moderate aktif apabila memiliki nilai $IC_{50} \geq 30 \mu\text{g/ml}$ dan $IC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$ dan dikatakan tidak aktif apabila nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak n-heksan daun botto'-botto' tidak aktif terhadap *cell line* kanker kolon WiDr karena nilai IC_{50} yang diperoleh lebih dari 100 $\mu\text{g/ml}$. Oleh karena itu penelitian ini akan lebih baik bila dilanjutkan pengujiannya dengan mengisolasi senyawa murni yang terkandung dalam ekstrak daun botto'-botto yang mampu memberikan reaksi aktif terhadap *cell line* kanker dengan hasil yang memenuhi kriteria.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa;

1. Ekstrak n-heksan daun botto'-botto' tidak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap *cell line* kanker kolon WiDr.
2. Nilai IC₅₀ ekstrak n-heksan daun botto'-botto' adalah 162,18 µg/ml. Hasil IC₅₀ yang diperoleh > 100 µg/ml sehingga disimpulkan tidak aktif sebagai antikanker.

B. Implementasi Penelitian

Data hasil penelitian ini menambah informasi mengenai bahan alam yang memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker. Sehingga atas dasar ini, untuk mengembangkan tanaman daun botto'-botto' sebagai agen antikanker perlu dilakukan fraksinasi hingga diperoleh senyawa murni yang aktif terhadap cell line kanker.

KEPUSTAKAAN

Al-Qur'an dan Terjemahannya

Akinmoladun, Afolabi C., Ibukun, E.O., Dan-Ologe, I.A. *Phytochemical Constituents and Antioxidant Properties of Extracts from the Leaves Of Chromolaena odorata*, scientific Research and Essay Volume 2. 2007

Arends, M.J. *Pathways of colorectal carcinogenesis*, Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2013

Berridge, M.V., and Tan, A.S. *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*, Arch Biochem Biophys. 1992

Brown DL. Wound. In: Brown DL, Borschel GH, editor. *Michigan Manual of Plastic Surgery 1st ed*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2004

Chen, T.R., Drabkowski, D., Hay, R.J., Macy, M., Peterson, W. *WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. Cancer genetic and cytogenetics*. 1987

Department of Natural Resources, Mines and Water. *Siam Weed Declared No 1*. Natural Resources, Mines and Water. Australia. Pesr Series Queensland. 2006

Dirjen POM. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. 1986

Doyle, A., dan Griffiths, J.B. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*, John Wiley and Sons. 2000

Fessenden, R.J., Fessenden, J.S. *Kimia Organik Jilid 2 Edisi ketiga*. Erlangga. Jakarta. 1992

Fotakis, G., and Timbrell, J.A. *In vitro cytotoxicity assays : Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*, Toxicology Letters. 2005

Freshney RI. *Culture of animal cells: A manual of basic technique*. 5th ed, NY, Wiley-Liss, Inc., 1986

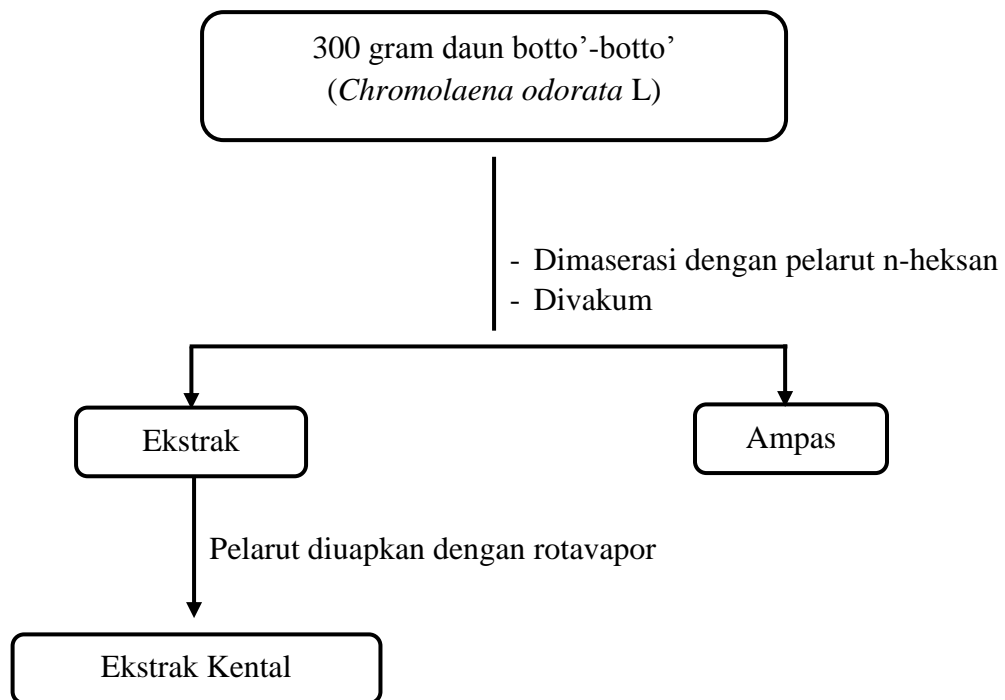
Gander, J.C., Gotzos, V., Fellay, B., Schwaller, B. *Inhibition of the proliferative cycle and apoptic events in WiDr cells after down-regulation of the calcium-binding protein calretinin using antisense oligodeoxynucleotides*, Experimenteal Cell Research. 1996

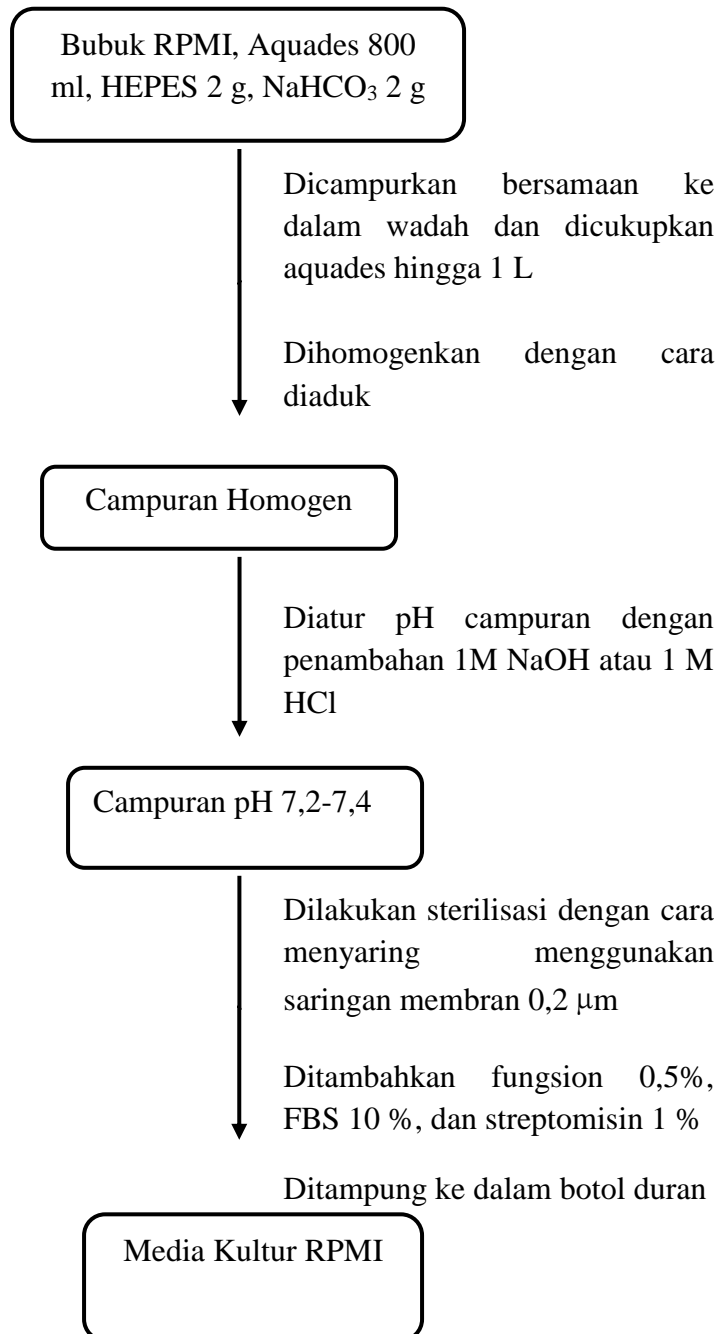
Guyton, A. C. *Fisiologi Kedokteran 2*, Jakarta : CV. EGC. 1983

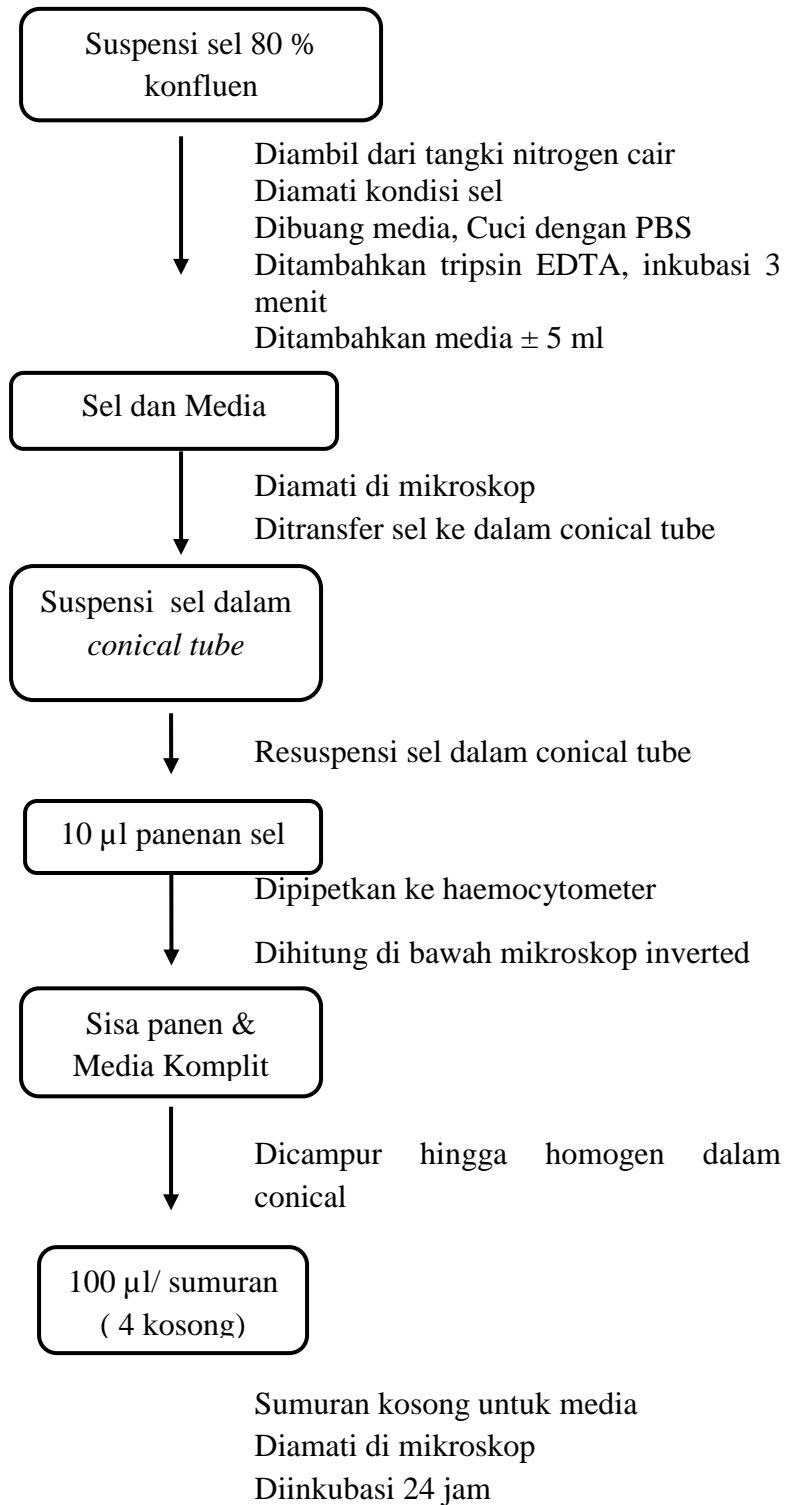
- Habritasari, Annisa. *Skrining Uji Toksisitas Ekstrak Etanol dan Ekstrak N-Heksan Daun Botto'-Botto' (Chromolaena Odorata) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test*. Skripsi Sarjana, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar. 2014
- Haggar FA and Boushey RP. *Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival and Risk Factors*. Thieme Medical Publisher. 2009.
- Harbone JB. *Phytochemical Methods*. Holdsted Press. New York. 1987
- Hermani dan Raharjo, M. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*, Penebar Swadaya. Jakarta. 2006
- Hondermarck H. *Breast Cancer. Molecular & Cellular Proteomics 2.5*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. 2003.
- Kartawiguna, Elna. *Faktor-Faktor yang Berperan pada Karsinogenesis*. Jakarta: Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti. 2001
- Kementrian Agama RI. *Al-qur'an Dan Tafsirnya Jilid 7*. Lembaga Percetakan Al-qur'an Department Agama. 2009
- Kementrian Agama RI Direktorat Jenderal Bimbingan Masyarakat Islam Direktorat Urusan Agama Islam dan Pembinaan Syariah. *Al-Qur'an dan Terjemahnya Mushaf Maqamat*. Jakarta: Institut Ilmu Alqur'an (IIQ). 2013
- Kementerian Kesehatan RI. *Buletin induk data dan informasi kesehatan : situasi penyakit kanker*. Jakarta. 2015
- Kusuma A.W., Nurulita N.A., Hartanti D. *Efek Sitotoksik dan Antiproliferasi Kuersetin pada Sel Kanker Kolon WiDr*. Purwokerto: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah. 2010
- Malole, M.B.M. *Kultur Sel dan Jaringan Hewan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. 1990
- Mardiah. *Makanan antikanker*. Jakarta: Kawan Pustaka. 2006
- Markowitz, S.D. and Bertagnolli, M.D. *Molecular Basis of Colorectal Cancer*, The New England Journal of Medicine. 2009
- Masfria dan Hafni A. *International Journal of PharmTech Research: Cytotoxicity of "Ekor naga" Leaf (Raphidophora pinnata (Lf) Schott) Chloroform Extract against T47D Cancer cells*. USA: IJPRIF. 2015.
- Masood, Ehsan. *Ilmuwan-ilmuwan Muslim Pelopor Hebat Di Bidang Sains Modern*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. 2009

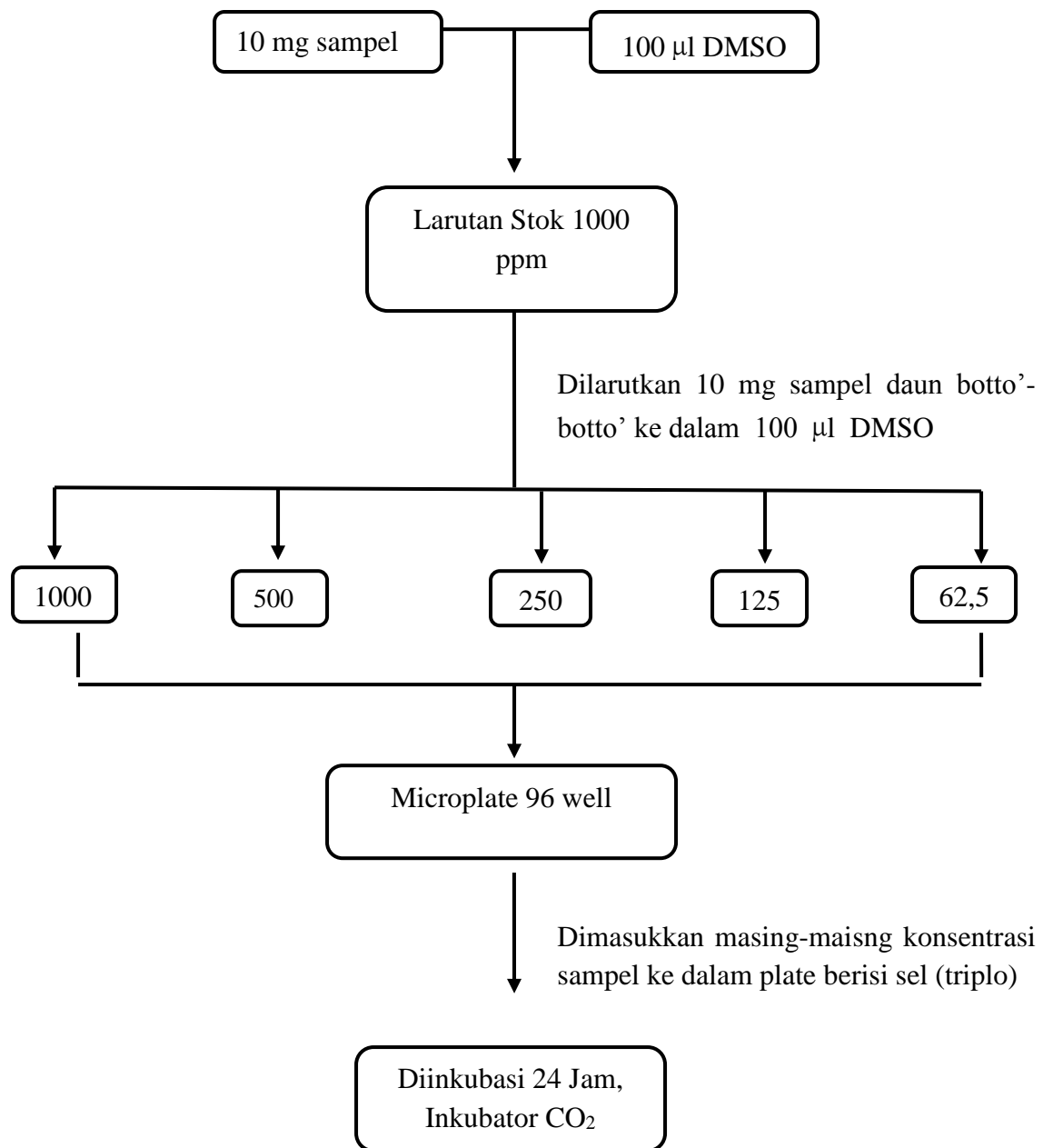
- Meerlo, J., Kaspers, G.J., and Closs, J. *Cell sensitivity assays: the MTT assay*, Methods Mol Bio. 2011
- Mossmann, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*, J. Immunol. Meth. 1983
- Ngozi, Igboh M., Jude, Ikewuchi C. and Catherine, Ikewuchi C. *Chemical Profile of Chromolaena odorata L. (King and Robinson) Leaves*. Pakistan Journal of Nutrition 8. 2009
- Noguchi, P., Wallace, J.J., Early, M.E., O'Brien S., Ferrone, S., Pellegrino, A.M., et al. *Characterization of WiDr : A Human Colon Carcinoma Cell Line, In Vitro*. 1979
- Nurulita, A. N. *Efek antikanker pentagamanvunon-0 (PGV-0) terhadap sel kanker payudara T47D yang diinduksi 17- β -estradiol melalui mekanisme induksi apoptosis dan penghambatan angiogenesis*. Thesis, Program Pasca Sarjana. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada. 2005
- Omotayo M.A., Avungabeto O., Sokefun O., dan Eleyewo O.O., *Antibacterial Activity of Crassocephalum crepidioides (Fireweed) and Chromolaena odorata (Siam weed) Hot Aqueous Leaf Extract*. Nigeria: International Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2015
- Pratiwi. *Skrining Uji Efek Antimitosis Ekstrak Daun Botto'-Botto' (Chromolaena odorata L.) Menggunakan Sel Telur Bulubabi (Tripneustus gratilla L.)*. Skripsi Sarjana, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar. 2014
- Prawiradiputra, Bambang R. 2006. *Ki Rinyuh (Chromolaena odorata (L.) R. M. King & H. Robinson): Gulma Padang Rumpun Yang Merugikan*. Bogor: Balai Penelitian Ternak
- Ruddon, Raymond W. *Cancer Biology fourth edition*. New York: Oxford University Press. 2007
- Shihab, M. Quraish. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-qur'an. Volume 10*. Jakarta: Lentera Hati. 2002
- Shihab, M. Quraish. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-qur'an. Volume 5*. Jakarta: Lentera Hati. 2009
- Sipayung, A., R.D. De Chenon and P.S. Sudharto. *Observations on Chromolaena odorata (L.) R.M. King and H. Robinson in Indonesia. Second international Workshop on the Biological Control and Management of Chromolaena odorata*. Biotrop, Bogor. 1991.
- Siuwerts, M.A., Klijn, M. G. J., Peters, A.H., and Foekens, A. J. *The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized : How to Use this Assay Reliably to*

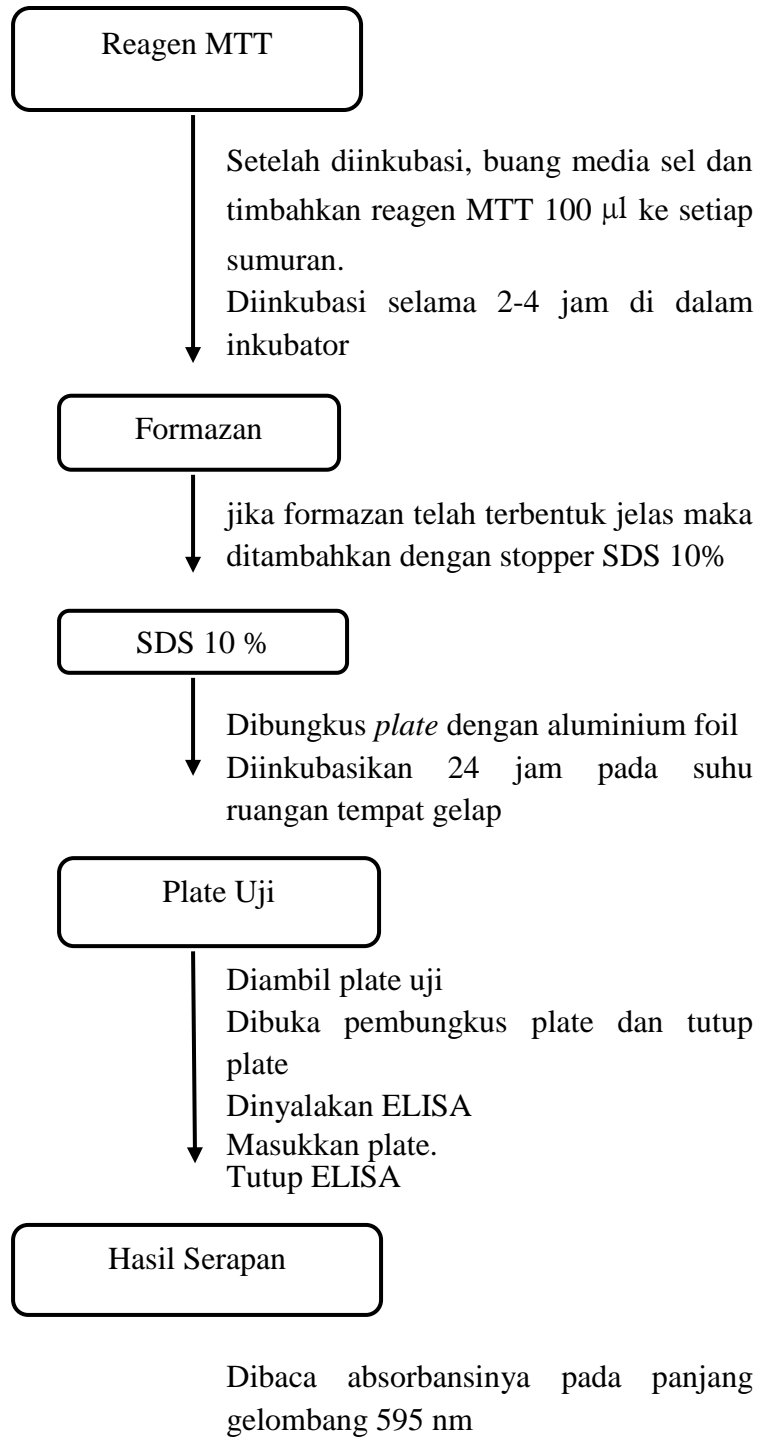
- Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assesment of Growth Characteristics. IC50-Values and cell Survival*, Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1995
- Soemitrat, Juli. *Toksikologi Lingkungan*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 2009
- Sofowora, A., *Guidelines for Research Promotion and Development in Traditional Medicine*. Nig J. Pharmacy. 1980
- Spackman, D.H., E.H. Stein and S. Moore, *Automatic Recording Apparatus for Use in The Chromatography of Amino Acids*. Analyt. Chem. 1985
- Sriwidiyani, N.P. Mutasi *K Ras pada Karsinogenesis Kanker Kolorektal*. Jurnal Ilmiah Kedokteran. 44 (2), 97-100. 2013
- Steinberg, M. *Colorectal Cancer, Screening Guidelines Update*. US Pharmacist. 2012
- Suriyavathana M et Al. *In-Vitro Antioxidant Activity of Chromolaena Odorata (L.) King and Robinson*. Department of Biochemistry, Periyar University. India. 2012.
- Suryo. *Genetika Manusia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. 2008.
- Tada, K, Shiho O., Kuroshima, K., Koyama, M., and Tsukamoto, K. *An Imprved Colometric Assay for Interleukin 2 in Immunological Methods*. Osaka Japan: Takeda Chemical industries ltd. 1986.
- Takasaki J, Saito T, Taniguchi M Kawasaki T, Montani Y, Hayasahi K, Kobori M, 2004 A novel Gaq/11- selective inhibitor. J Biol Chem 279: 47 433- 47- 445
- Tatuhey, W.S., Nikijuluw, H., Mainase, J., Karakteristik Kanker Kolorektal Di RSUD Dr. M Haulussy Ambon Periode Januari 2012-Juni 2013. Molucca Medica: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Volume 4. 2014
- Thamrin, M., Asikin S., dan Willis M. *Tumbuhan Kirinyu Chromolaena odorata (L) (Asteraceae: Asterales) Sebagai Insektisida Nabati Untuk Mengendalikan Ulat Grayak Spodoptera litura*. Balai Penelitian Pertanian Lahan Rawa. Kalimantan Selatan. 2013
- The Plants database (Version 5.1.1). *National Plant Data Center*, NRCS, United States Department of Agriculture, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. 2000
- Vital, P.G, dan Rivera, W.L. *Antimicrobial activity and cytotoxicity of Chromolaena odorata (L.) king and Robinson and Uncaria perrottetii Merr. Extracts*. Journal of Medical Plants Research Volume 3. 2009
- Yazid bin Abdul Qadir Jawas. *Pentingnya penyembuhan dengan Al-Qur'an dan As-Sunah*, 2011

SKEMA KERJA**Lampiran 1. Penyiapan Sampel**

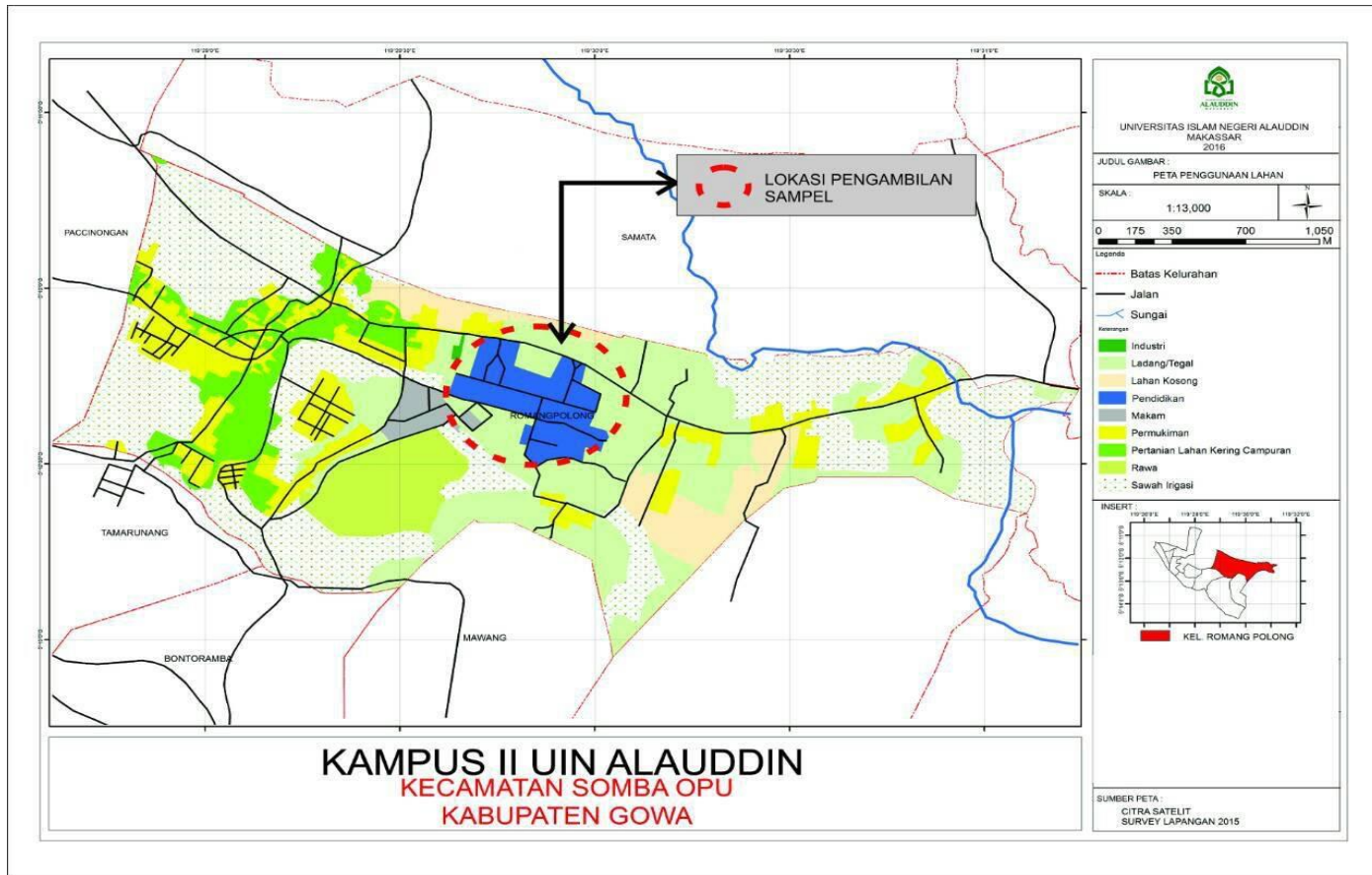
Lampiran 2. Pembuatan Media Kultur

Lampiran 3. Penanaman Sel

Lampiran 4. Preparasi Sampel dan *Treatment*

Lampiran 5. Uji Sitotoksik MTT

Lampiran 6. Denah Lokasi Pengambilan Sampel dan Gambar Sampel

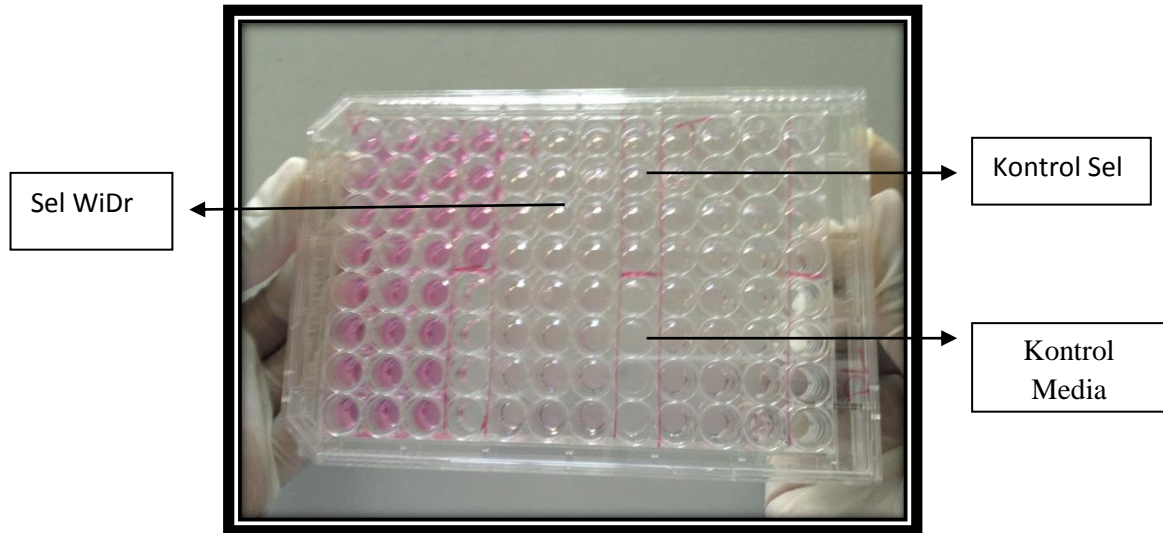


Gambar 1. Lokasi Pengambilan Sampel Daun Botto'-Botto'

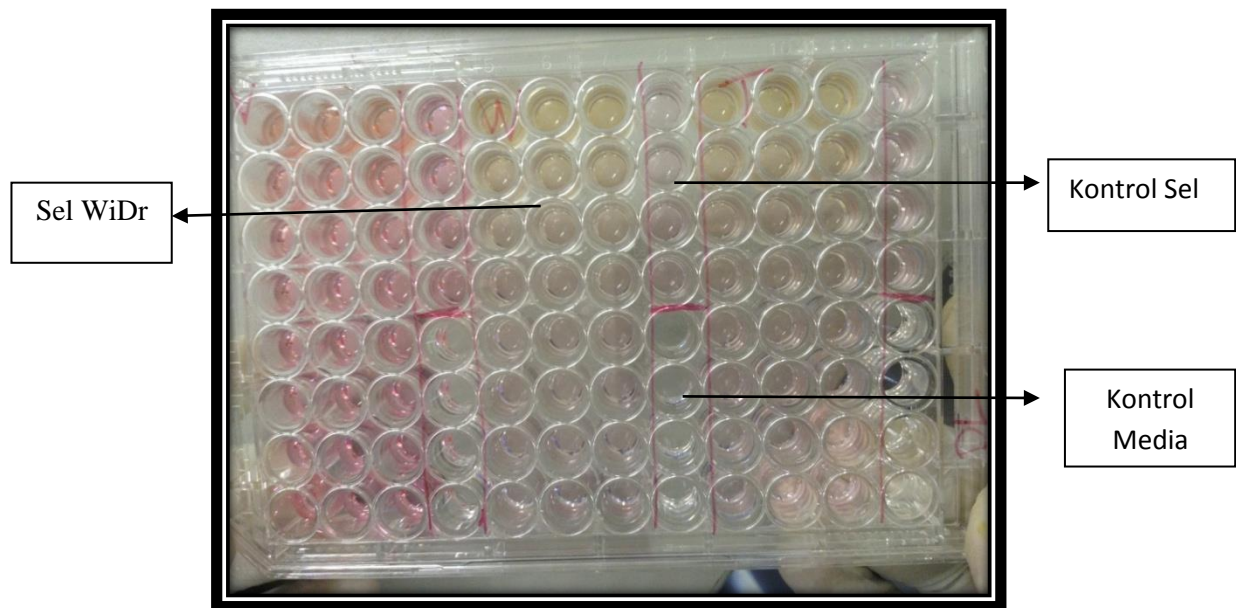


Gambar 2. Sampel Daun Botto'-Botto' (*Chromolaena odorata* L.)

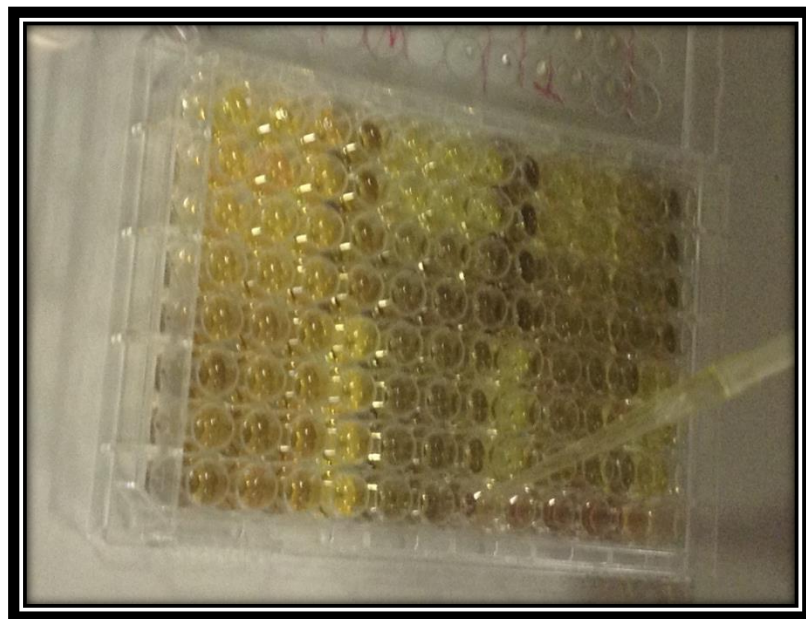
Lampiran 7. Uji Sitotoksik Metode MTT



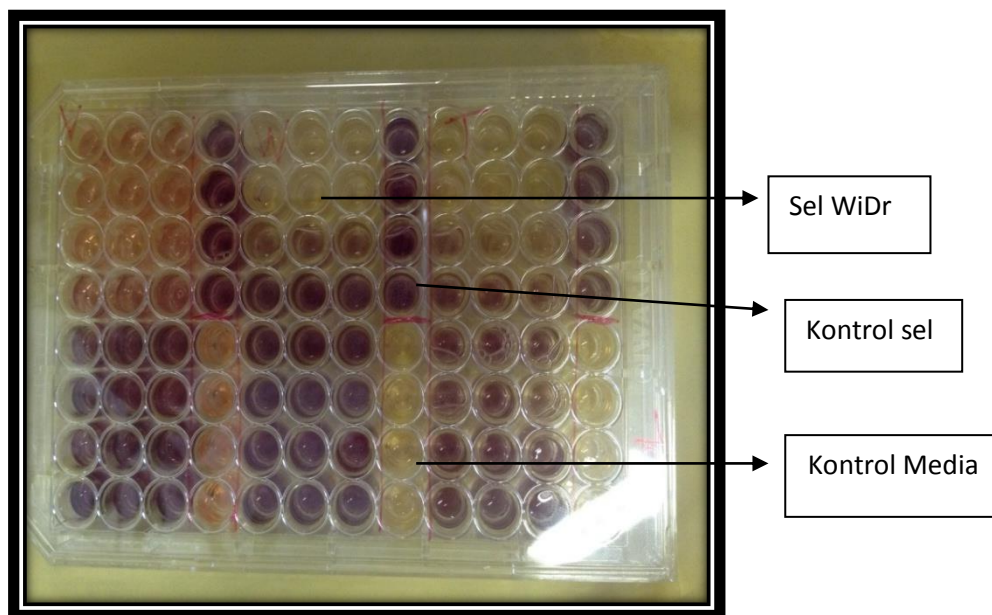
Gambar 3. Kondisi Sel Sebelum dilakukan *treatment*



Gambar 4. Setelah treatment pemberian sampel uji

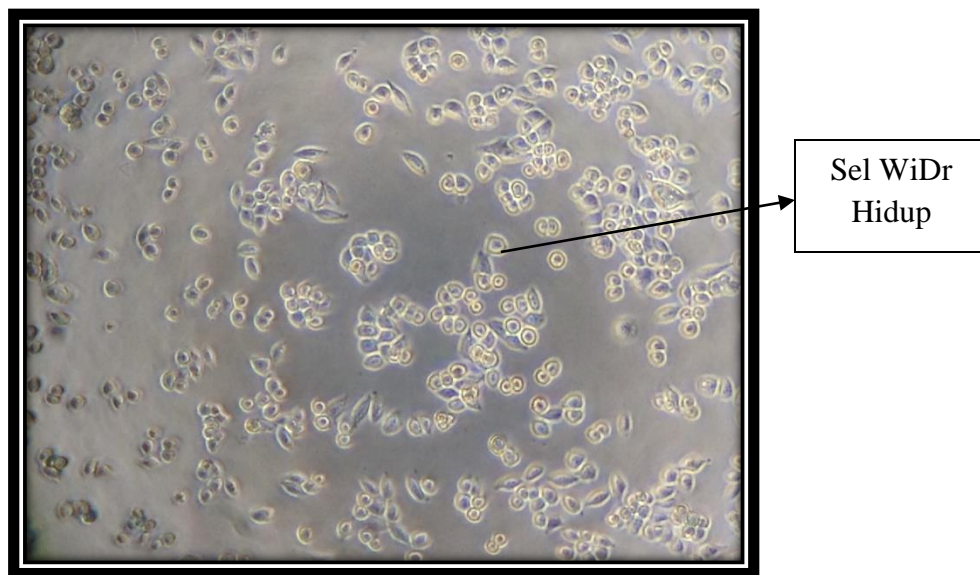


Gambar 5. Setelah pemberian reagen MTT dan telah diinkubasi 24 jam



Gambar 6. Setelah Pemberian SDS dan telah diinkubasi 24 jam

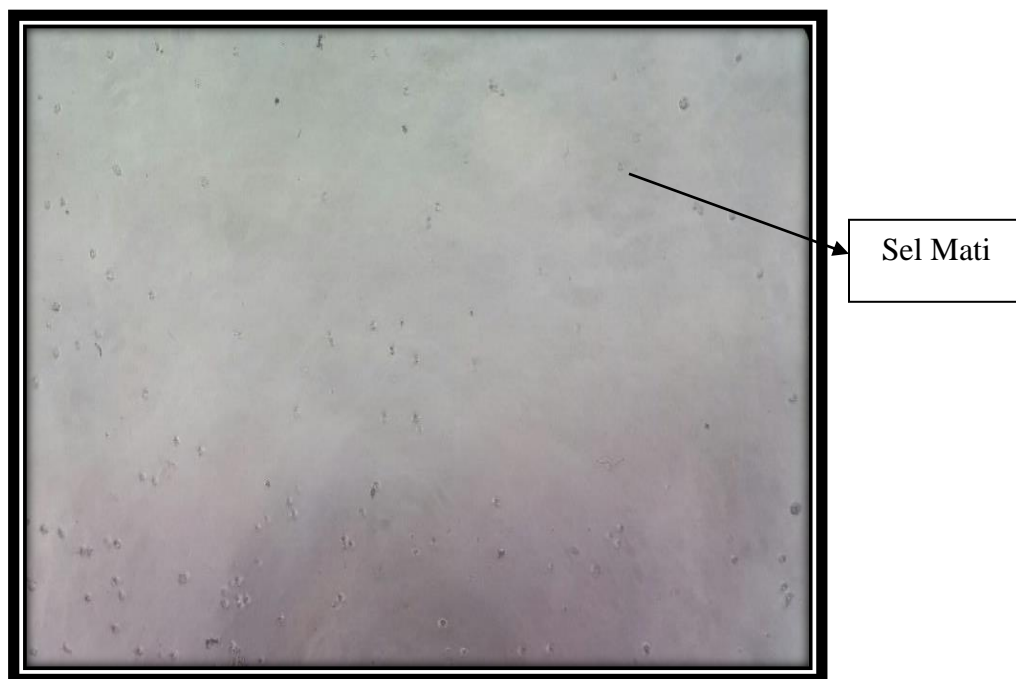
Lampiran 8. Sel WiDr Sebelum dan setelah *treatment*



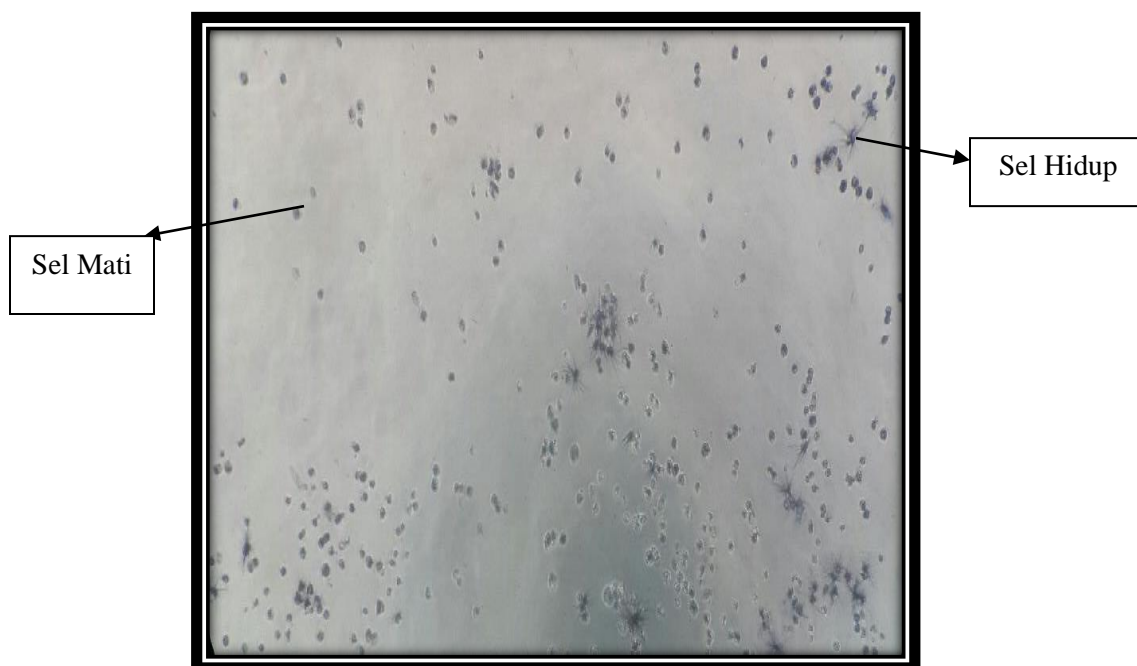
Gambar 7. Sel WiDr Sebelum Treatment



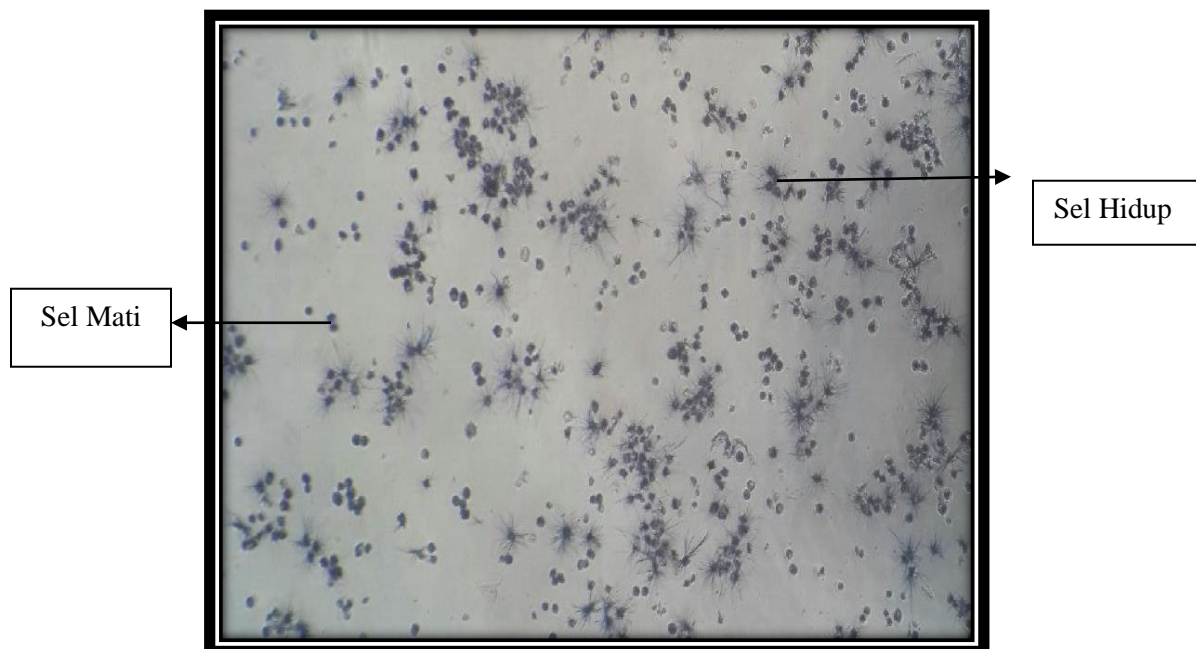
Gambar 8. Hasil treatment sel pada konsentrasi 1000 µg/ml



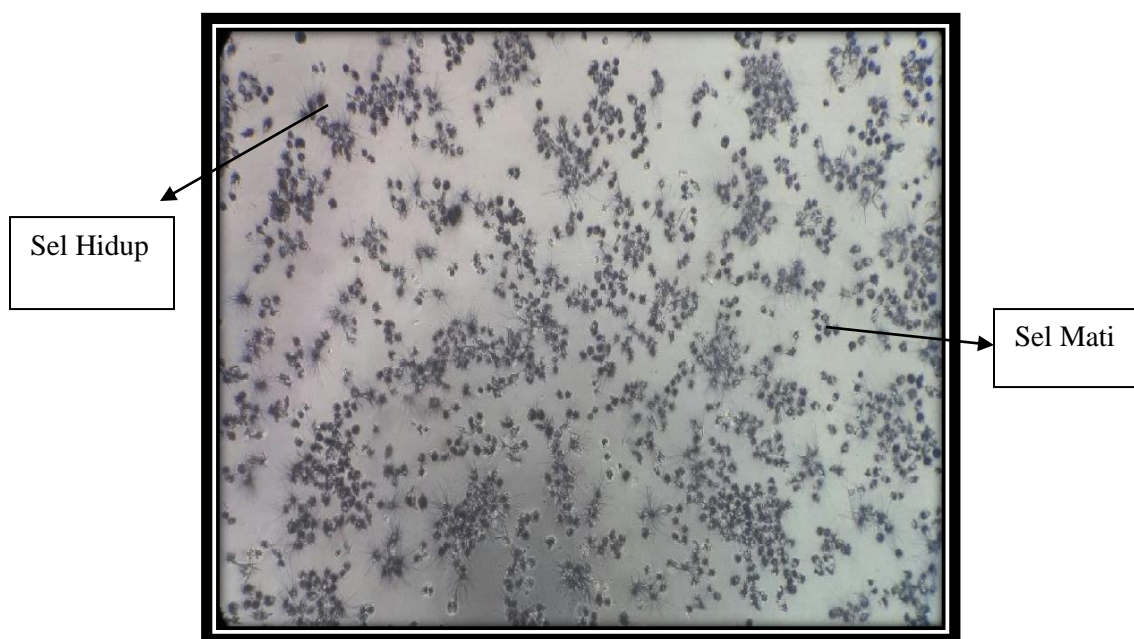
Gambar 9. Hasil treatment sel pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$



Gambar 10. Hasil treatment sel pada konsentrasi 250 $\mu\text{g/ml}$

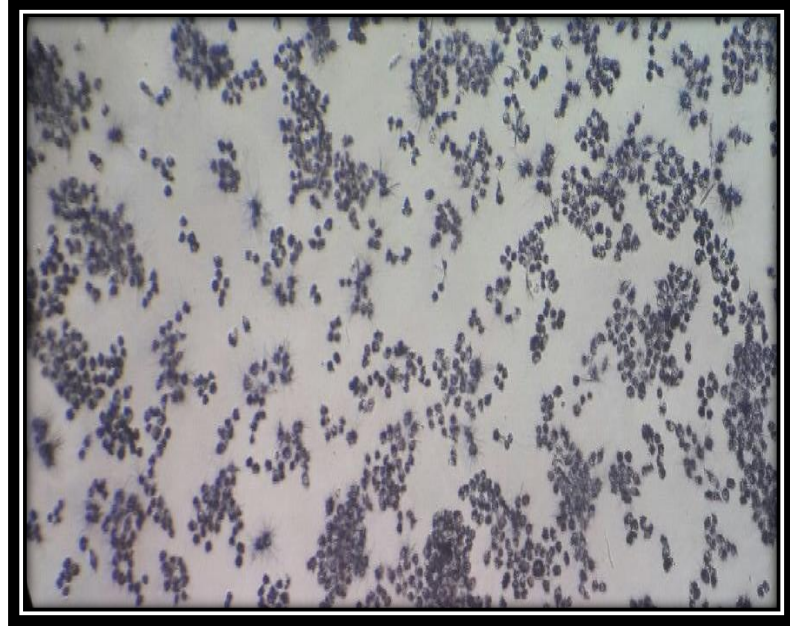


Gambar 11. Hasil treatment sel pada konsentrasi 125 µg/ml



Gambar 12. Hasil treatment sel pada konsentrasi 62,5 µg/ml

Lampiran 9. Kontrol negatif sel WiDr



Gambar 13. Kontrol Sel



Gambar 14. Kontrol Media

Lampiran 10. Perhitungan

$$\begin{aligned}
 \text{a. Rendemen \%} &= \frac{\text{jumlah ekstrak yang dihasilkan}}{\text{jumlah simplisia sebelum diolah}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,5 \text{ g}}{300 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 0,16 \%
 \end{aligned}$$

$$\text{b. Jumlah sel WiDr yang dihitung} = 198 \times 10^4$$

$$\text{c. Volume panen sel WiDr yang ditransfer} = 30 \times 10^4 / 198 \times 10^4 = 0,151$$

$$\text{d. Volume MK RPMI 1640} = 30 \times 100 \mu\text{l} = 30000 \mu\text{l} = 3 \text{ ml}$$

e. Ekstrak n-heksan daun botto'-botto'

Stok = 10,1 mg dalam 100 μl DMSO

Pengenceran sampel Uji

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

V_1 = Volume sampel uji

N_1 = 10 mg (sampel uji) dalam 100 μl DMSO

$$10.000 \mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$$

$$100.000 \mu\text{g/ml}$$

V_2 = Volume (medium + sampel uji)

N_2 = 1000 $\mu\text{g/ml}$ (konsentrasi ke 1 yang ingin dibuat)

$$V_1 \cdot 100.000 \mu\text{g/ml} = 1600 \mu\text{l} \cdot 1000 \mu\text{g/ml}$$

$$V_1 = 16 \mu\text{l} \text{ (sampel uji)}$$

$$\text{Volume Medium Komplit RPMI} = 1600 - 16 = 1584 \mu\text{l}$$

f. *Persen sel Hidup* =

$$\frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

1. Konsentrasi 1000 ppm

$$\% \text{ sel Hidup} = \frac{0,096 - 0,08}{0,877 - 0,08} \times 100\% = 2,007 \%$$

$$\% \text{ inhibisi} = 100\% - 2,007\% = 97,993\%$$

2. Konsentrasi 500 ppm

$$\% \text{ sel Hidup} = \frac{0,095 - 0,08}{0,877 - 0,08} \times 100\% = 1,727 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 100 \% - 1,727 \% = 98,3$$

3. Konsentrasi 250 ppm

$$\% \text{ sel Hidup} = \frac{0,323 - 0,08}{0,877 - 0,08} \times 100\% = 30,37 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 100 \% - 30,37 \% = 69,6 \%$$

4. Konsentrasi 125 ppm

$$\% \text{ sel Hidup} = \frac{0,7076 - 0,08}{0,877 - 0,08} \times 100\% = 78,69 \%$$

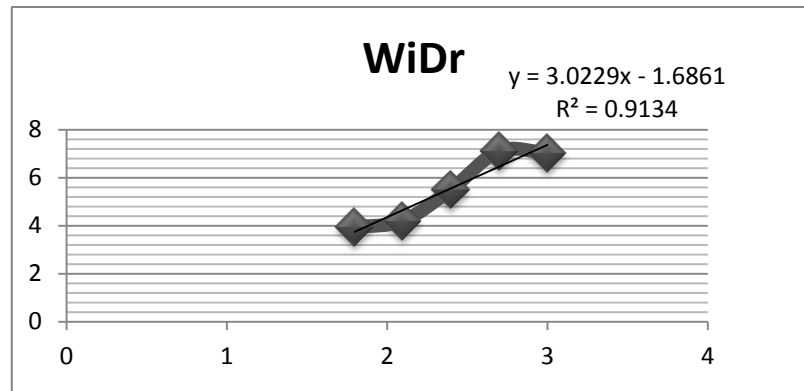
$$\% \text{ Inhibisi} = 100 \% - 78,69 \% = 21,3 \%$$

5. Konsentrasi 62,5 ppm

$$\% \text{ sel Hidup} = \frac{0,761 - 0,08}{0,877 - 0,08} \times 100\% = 85,47 \%$$

$$\% \text{ Inhibisi} = 100 \% - 85,47 \% = 14,5 \%$$

Lampiran 11. Grafik Probit Log-Konsentrasi dan Perhitungan IC_{50} Ekstrak N-Heksan Daun Botto'-Botto' (*Chromolaena odorata* L.)



Gambar 15. Grafik Probit Log-Konsentrasi Ekstrak N-Heksan Botto'-Botto'

Persamaan Garis Linear:

$$Y = a + bx$$

Y = Persentase respon kematian dalam satuan probit

x = Log – Konsentrasi ekstrak n-heksan botto'-botto'

a = Intersep

b = Slop

Berdasarkan data grafik di atas diperoleh

$$a = -1,686$$

$$b = 3,022$$

$$r = 0,913$$

Sehingga diperoleh persamaan:

Nilai IC_{50} untuk ekstrak n-heksan daun botto'-botto'

$$Y = a + bx$$

$$5 = -1,686 - 3,022x$$

$$x = \frac{5 + 1,686}{3,022} = 2,212$$

$$IC_{50} = \text{Antilog } 2,212$$

$$IC_{50} = 162,18 \mu\text{g/ml}$$



RIWAYAT HIDUP

Peneliti bernama lengkap Anitsah Fiqardina, akrab disapa dengan Anny. Lahir di Bulukumba pada tanggal 13 Desember 1993. Anak kedua dari lima bersaudara dari pasangan suami istri H. Muhammad Nasrum, SE., MARS dan Hj. Irmawati, S.Pd., M.M. Pendidikan formal yang telah dilalui adalah Taman Kanak-Kanak Negeri Pembina Bulukumba pada Tahun 1999. Selanjutnya jenjang pendidikan di Sekolah Dasar Negeri 7 Matajang Bulukumba pada Tahun 2000-2006. Kemudian jenjang yang lebih tinggi di Pondok Pesantren Puteri Ummul Mukminin Makassar selama 3 tahun yaitu sejak tahun 2006-2009. Kemudian ke tingkat menengah atas di SMA Negeri 8 Bulukumba 2009-2012 dan kuliah jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan di Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.

